

## Abschlussbericht

für das Projekt 2813HS001 zur wissenschaftlichen Entscheidungshilfe zum Thema

### „Prävalenz von ESBL-bildenden *Escherichia coli* bei Mastputen zur Quantifizierung der relativen Bedeutung von Mastgeflügel und möglichen Eintragsquellen“

Akronym: ESBL@Pute



Dr. Anika Frieze und Prof. Dr. Uwe Rösler

Institut für Tier- und Umwelthygiene

Freie Universität Berlin

Robert-von-Ostertag-Straße 7-13, 14163 Berlin

Berichts- und Projektzeitraum:  
1. Januar 2014 bis 31. März 2016

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG DES VORHABENS .....</b>	<b>1</b>
1.1. PLANUNG UND ABLAUF DES VORHABENS.....	2
1.2. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND ZUM PROJEKTSTART .....	4
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>6</b>
2.1. QUERSCHNITTSTUDIE.....	6
2.2. LONGITUDINALSTUDIE .....	8
2.3. LABORDIAGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	10
2.4. STATISTIK.....	11
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>13</b>
3.1. AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG DER WICHTIGSTEN ERGEBNISSE .....	13
3.1.1. <i>Querschnittsstudie</i> .....	13
3.1.2 <i>Longitudinalstudie</i> .....	22
3.2. VORAUSSICHTLICHER NUTZEN UND VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE .....	34
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>36</b>
<b>5. GEGENÜBERSTELLUNG DER URSPRÜNGLICH GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH ERREICHTEN ZIELEN .....</b>	<b>38</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>40</b>

## 1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Ziel dieses Projektes war die Erfüllung eines Entscheidungshilfebedarfs des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), wissenschaftliche Untersuchungen zum Vorkommen von Extended-Spektrum-Beta-Laktamase (ESBL) bzw. AmpC-Beta-Laktamase - bildenden *Escherichia (E.) coli* in Mastputenbeständen durchzuführen. Zu beantwortende Fragen waren:

- Ist das Vorkommen von ESBL-bildenden *E. coli* in Putenbeständen vergleichbar zur Situation beim Masthähnchen?
- Breiten sich ESBL-bildenden *E. coli* in Putenbeständen auf den gleichen Wegen aus wie bei Masthähnchen?
- Welche ESBL-Gene treten bei den gefundenen Isolaten auf?

Die Herdenprävalenz sollte dabei in einer repräsentativen Querschnittstudie, in welcher Mastputenbestände in ganz Deutschland untersucht werden, erhoben werden. Die Ausbreitungswege der ESBL/AmpC-bildenden Enterobakterien sollten mit Hilfe von Longitudinalstudien beschrieben werden, in welchen ausgewählte Betriebe sehr intensiv mehrmalig in einem Mastdurchgang beprobt und analysiert werden. Eine weitere Aufgabenstellung des Vorhabens waren die weiterführenden Untersuchungen der ESBL/AmpC-verdächtigen Isolate zur genauen Bestimmung der vorkommenden Resistenzgene und damit der genauen ESBL/AmpC-Beta-Laktamase-Typen. Die Ergebnisse sollen mit den schon abgeschlossenen Studien zu anderen Tierarten (Schwein, Masthähnchen, Rind) im Rahmen des RESET I – Forschungsverbundes verglichen werden. Dazu sollen die hier im Projekt generierten Daten in die schon vorhandene Datenbank des RESET-Verbundes eingepflegt werden und stehen somit für erweiterte epidemiologische Untersuchungen zur Verfügung.

### 1.1. Planung und Ablauf des Vorhabens

Initial waren für die im Arbeitsplan beschriebenen Hauptaufgabenbereiche eine Laufzeit von 18 Monaten vorgesehen (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Zeitplan aus Antragstellung**

Teilaufgabe/-projekt	2014				2015			
	Quartal				Quartal			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Task 1: Auswahl der für die Untersuchungen geeigneten typischen Mastputenställe	■	■	■					
Task 2: Querschnitts-Untersuchung von 40 Mastputenbeständen	■	■	■	■				
Task 3: Longitudinal-Untersuchung von 7 Mastputenbeständen		■	■	■	■			
Task 4: molekularbiologische Bestätigung des ESBL-Status			■	■	■			
Berichtswesen und Vorbereitung wiss. Publikationen					■	■		

Es zeichnete sich bereits am Ende des ersten Projektjahres ab, dass die Akquirierung der benötigten Betriebe für die Querschnitt- sowie die Longitudinalstudie länger als geplant in Anspruch nahm. Die Vorbehalte der Landwirte hinsichtlich möglicher Konsequenzen für die gesamte Branche bei Nachweis der resistenten Erreger waren anfangs sehr groß. Im Rahmen persönlicher Gespräche und mit der sehr guten Zusammenarbeit und Hilfe der betreuenden Tierärztinnen und Tierärzten konnten wir durch Aufklärung zu dieser Thematik die Vorbehalte zunehmend ausräumen und so nach und nach Betriebe zur Teilnahme an dieser Studie motivieren. Jedoch war dies deutlich zeitintensiver als vorgesehen. Zudem wurde Anfang November 2014 das hochpathogene aviäre Influenzavirus H5N8 in putenhaltenden Betrieben nachgewiesen, was behördlich angeordnete Zugangsbeschränkungen für betriebsfremde Personen zur Folge hatte. Dies betraf vor allem die tierdichte Region im Norden und Nordwesten Deutschlands, wo die Mehrzahl der

Betriebe in der Querschnittstudie untersucht werden sollten. Dies erschwerte abermals eine Gewinnung von Betrieben für die Studie. Daher wurde unserem Antrag auf Projektverlängerung vom 18. Dezember 2014 um 6 Monate stattgegeben.

Letztlich fanden die letzten Probenahmen der Longitudinalstudie im Juli 2015, die der Querschnittstudie im September 2015 statt, an welche sich noch zahlreiche labordiagnostische Untersuchungen der Isolate anschlossen, bevor eine finale Ergebnisauswertung erfolgen konnte. Um eine valide und umfangreiche Ergebnisdarstellung und Auswertung der sehr umfangreichen und mit hohem Detailgrad erhobenen Daten zu generieren, wurde einem Antrag auf Laufzeitverlängerung um weitere drei Monate stattgegeben, so dass die gesamte Projektlaufzeit letztendlich 27 Monate betrug. Damit ergab sich der in Tabelle 2 dargestellte angepasste Zeitplan.

**Tabelle 2: Angepasster Zeitplan**

Teilaufgabe/-projekt	2014				2015				2016
	Quartal				Quartal				Quar- tal
	1	2	3	4	1	2	3	4	1
Task 1: Auswahl der für die Untersuchungen geeigneten typischen Mastputenställe									
Task 2: Querschnitts-Untersuchung von 46 Mastputenbeständen									
Task 3: Longitudinal-Untersuchung von 7 Mastputenbeständen									
Task 4: molekularbiologische Bestätigung des ESBL-Status									
Statistische Auswertung, Berichtswesen und Vorbereitung wiss. Publikationen									

Des Weiteren wurde ein Kriterium der Betriebsauswahl für die Querschnittstudie beim Projektstart angepasst. Ursprünglich sollte die Auswahl komplett analog zu den schon im RESET-I-Forschungsverbund erfolgten Studien in Schweinemast-, Hähnchenmast- und Rinderbetrieben erfolgen. Dabei wurden 40 Betriebe je Tierart untersucht. Die Regionen, in

welchen die Tierbestände beprobt wurden, wurden anhand der Daten zu Tier- und Betriebsdichte sowie der Bevölkerung definiert und bestimmte Landkreise wurden für die Studie ausgewählt (Merle et al., 2012).

Bei dieser Festlegung der Regionen wurden im RESET-Forschungsverbund jedoch keinerlei Daten bezüglich Putenmastbetrieben berücksichtigt, so dass wir die Verteilung der zu untersuchenden Betriebe innerhalb Deutschlands selbst definieren mussten, um ein systematisches, repräsentatives Screening durchführen zu können. Wir haben dazu die Daten zur Tieranzahl sowie Betriebszahl für jedes Bundesland (außer die Städte Hamburg, Bremen und Berlin) zusammengetragen. Anhand der Tierzahl wurde der prozentuale Anteil der Putenmasthaltung für jedes Bundesland berechnet und danach die Anzahl der zu untersuchenden Betriebe bezogen auf die angestrebte Gesamtzahl  $n=40$  berechnet. Durch Aufrundung der Betriebszahl ergaben sich 46 Betriebe, die auf ihren ESBL/AmpC-Status getestet werden sollten. Die Bundesländer Saarland sowie Rheinland-Pfalz blieben letztlich auf Grund der sehr geringen Tierzahl und der dort dominierenden Hobby- und Kleinsthaltungen unberücksichtigt. Eine Übersicht zur Berechnung gibt Tabelle 3.

## **1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand zum Projektstart**

Extended-Spektrum-Beta-Laktamase (ESBL)- und AmpC-Beta-Laktamase (AmpCs) - bildende Enterobakterien (zusammengefasst als „ESBLs“) können moderne und äußerst wichtige Antibiotika wie z.B. Cephalosporine der 3. und 4. Generation spalten und schränken somit therapeutische Möglichkeiten in Human- und Tiermedizin zunehmend ein. Durch Untersuchungen der letzten Jahre ist eine Verbreitung dieser resistenten Bakterien und dabei insbesondere von kommensalen ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* bei verschiedenen Nutztieren wie Schweinen (Friese et al., 2013; Hansen et al., 2013), Geflügel (Costa et al., 2009; Friese et al., 2013), Rindern (Geser et al., 2012; Schmid et al., 2013), Pferden (Johns et al., 2012), aber auch Fischen aus Aquakultur (Jiang et al., 2012) zu verzeichnen. Das Geflügel betreffend sind v.a. Masthähnchen in verschiedenen internationalen Studien eingehend untersucht worden, wobei hohe Prävalenzen mit z.T. bis zu 100% Prävalenz auf Herdenebene nachgewiesen wurden (Costa et al., 2009; Dierikx et al., 2013; Friese et al., 2013; Geser et al., 2012; Machado et al., 2008). In detaillierten Untersuchungen im Rahmen des nationalen Forschungsverbundes RESET-I wurde zum einen erstmals das Vorkommen dieser resistenten Erreger deutschlandweit (Querschnittsstudie), zum anderen die Prävalenzentwicklung während einer Mastperiode sowie eine Verbreitung der Bakterien inner- und außerhalb von Masthähnchenställen erforscht. Ergebnisse der Querschnittsstudie

zeigten flächendeckend eine sehr hohe Verbreitung von ESBL-Bildern in Masthähnchenbeständen in Deutschland. Auch in den umfangreicheren Studien in ausgewählten Masthähnchenbeständen wurden hohe Detektionsraten ESBL/AmpC-bildender *E. coli* in Tierproben, aber auch in Proben der Tier- bzw. der Stallgebäudeumgebung erfasst (Laube et al., 2013). Auffällig war vor allem der Nachweis der resistenten *E. coli* in Kloakentupfern von Eintagsküken am Tag der Einstallung. Zudem wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* auch in 71,4 % aller untersuchten Sammelstaubproben (n = 21) gefunden und vereinzelt auch in Stallluftproben. Die Untersuchungen zur möglichen Emission von ESBL/AmpC-Bildnern zeigten verschiedene Wege auf, wobei der fäkale Austrag über die Düngung (inklusive Spülwasseraustrag) der Felder der dominierende Weg zu sein scheint, obgleich auch einige wenige Außenluftproben positiv getestet wurden, wobei dabei ein Bezug zu Isolaten aus dem Tierstall hergestellt werden konnte. Bezüglich der Tierart Pute gab es weder international noch national vergleichbare Daten einer flächendeckenden Querschnittsstudie oder von Langzeituntersuchungen. Wenige europäische Studien berichteten über Nachweise von ESBL/AmpC-bildenden Enterobakterien mit schwankenden Prävalenzen von 5,2 – 6,9 % in Großbritannien (Randall et al., 2011), 20 % in der Tschechischen Republik oder 48 % ESBL-verdächtige Herden in Polen (Wasyl et al., 2012). Wissenschaftler aus Spanien testeten auch Putenfleisch bereits positiv auf ESBL/AmpC-bildende *E. coli* (Egea et al., 2012). Zur Verbreitungssituation in Deutschland jedoch, existierten noch keine validen Daten, genauso wenig zum Auftreten, der Verbreitung und Prävalenzentwicklung der resistenten Bakterien innerhalb einer Mastperiode.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Querschnittstudie

#### **Auswahl der Betriebe**

Im Rahmen der Querschnittstudie wurden Putenmastbetriebe deutschlandweit auf das Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden Enterobakterien, speziell *E. coli*, untersucht. Dabei wurden konventionelle Putenmasthaltungen beprobt. Die Tierzahl pro Betrieb sollte optimalerweise bei mindestens ca. 10.000 Tieren liegen und die Betriebe sollten sowohl Aufzucht- als auch Mastherden halten. Bei der Festlegung der zu untersuchenden Betriebszahl auf  $n \geq 40$  wurde sich an die schon erfolgten und analog durchgeführten Studien bei anderen Tierarten (Mastschwein, Masthähnchen, Rind) im Rahmen des RESET I – Forschungsverbundes orientiert. Die geographische Verteilung der in unsere Studie aufgenommenen Betriebe richtete sich nach der Anzahl der in den verschiedenen Bundesländern gehaltenen Puten. Daraus wurde der prozentuale Anteil an der Gesamtputenpopulation und folglich daraus die zu untersuchende Mindestanzahl an Betrieben in den jeweiligen Bundesländern im Rahmen dieser Studie ermittelt. Durch Aufrundung der errechneten Werte ergab sich schlussendlich eine Betriebszahl von  $n = 46$  mit verschiedenen zu untersuchenden Betriebszahlen in den einzelnen Bundesländern (Tabelle 3). Die Bundesländer Rheinland-Pfalz sowie Saarland wurden nicht berücksichtigt, da die Tierzahlen sehr gering sind und wir keine konventionellen Haltungen ausfindig machen konnten. Es handelt sich dort überwiegend um Hobby- oder andere Kleinsthaltungsformen, die in diesem Fall für eine deutschlandweite Prävalenzerfassung vernachlässigt werden konnten.



**Tabelle 3: Übersicht der Betriebsauswahl im Rahmen der Querschnittstudie**

Bundesland	Anzahl der Puten je Bundesland*	Prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation in Deutschland	Kalkulation der zu untersuchenden Betriebe (ausgehend von n ≥ 40)	Aufgerundete Betriebszahl	Anzahl untersuchter Betriebe
Brandenburg	1.054.430	9 %	3,72	4	4
Mecklenburg-Vorpommern	379.277	3 %	1,34	2	3
Sachsen	194.878	2 %	0,69	1	1
Sachsen-Anhalt	1.156.191	10 %	4,08	5	5
Thüringen	183.449	2 %	0,65	1	1
Niedersachsen	4.871.768	43 %	17,18	18	17
Schleswig-Holstein	70.337	1 %	0,25	1	1
Baden-Württemberg	927.671	8 %	3,27	4	6
Bayern	809.900	7 %	2,86	3	3
Hessen	117.501	1 %	0,41	1	1
Nordrhein-Westfalen	1.557.910	14 %	5,49	6	6
Rheinland-Pfalz	19.620	0 %	0,07	0	0
Saarland	960	0 %	0,00	0	0
<b>GESAMT</b>	<b>11343892</b>	<b>100 %</b>	<b>40</b>	<b>46</b>	<b>48</b>

\*Ermittlung anhand statistischer Berichte der einzelnen Bundesländer basierend auf der Landwirtschaftszählung von 2010 bzw. Erfassungen aus 2003 (Saarland).

Wie Tabelle 3 zu entnehmen, wurde mit Ausnahme von Niedersachsen in jedem Bundesland die errechnete zu untersuchende Betriebszahl erreicht. In Niedersachsen wurden 17 anstatt der geforderten 18 Betriebe in die Studie aufgenommen. Die Akquirierung von Betrieben in Niedersachsen war u.a. auf Grund der Tierseuchenlage (Auftreten und Verbreitung von Influenza in Putenbetrieben) zum Studienzeitpunkt recht schwierig, da in derartigen Situationen der Besucherverkehr in Tierhaltungen auf das nötigste Maß begrenzt werden muss und auch danach die Bereitschaften unbekanntem Personen Zugang zu gewähren eher

zurückhaltend war. So sagte leider kurzfristig der 18. Betrieb die Teilnahme an der Studie zu einem sehr späten Zeitpunkt im Projekt ab, so dass zeitnah kein weiterer Betrieb mehr gewonnen werden konnte.

Dafür konnten in Mecklenburg-Vorpommern und Baden-Württemberg ein bzw. zwei zusätzliche Betriebe akquiriert werden, so dass letztlich mit insgesamt 48 untersuchten Betrieben die Zielvorgabe von 46 übererfüllt wurde.

### ***Probenahme in der Querschnittstudie***

In jedem Betrieb wurden, insofern vorhanden, eine junge Altersgruppe (sog. Aufzuchtherde) sowie eine ältere Altersgruppe (sog. Mastherde), welche sich zeitgleich im Betrieb aufhielten, beprobt. Überwiegend befanden sich diese Tiergruppen in verschiedenen Ställen, aber in unmittelbarer Nähe auf dem Betriebsgelände. Vereinzelt waren deren Stallgebäude aber auch wenige Kilometer entfernt voneinander.

In jeder Herde wurden folgende Proben gesammelt:

- 3x Sammelkotprobe, gepoolt aus zehn verschiedenen Kothaufen
- 1x Sockentupferprobe mittels Abschreitens der gesamten Stalllänge
- 1x Sammelstaubprobe von verschiedenen Stellen im gesamten Stall

In jedem Betrieb wurden demnach zehn Proben, fünf in der Aufzuchtherde und fünf in der Mastherde, entnommen. Zudem wurde ein standardisiertes Protokoll sowie ein Fragebogen erhoben, in welchen Daten zur jeweilig beprobten Herde, zum Betriebsmanagement, -hygiene, Antibiotikagaben und Lage des Betriebs erfasst wurden. Diese Daten sollen, wie im Antrag erwähnt, im Anschluss an das eigentliche Projekt zur Ermittlung eines Zusammenhangs von Betriebs- oder Managementfaktoren zu der ESBL/AmpC-Prävalenz dienen.

## ***2.2. Longitudinalstudie***

Bei dieser Studie des Projektes wurden sieben Mastputenbetriebe mit einem positiven ESBL/AmpC-Status, welcher vorher in der Querschnittstudie ermittelt wurde, intensiver analysiert. Es wurde jeweils eine Herde des Betriebes zu drei Zeitpunkten (Einstellung der Küken, Mitte und Ende der Mastperiode) mit umfangreichen Proben innerhalb des Stalls sowie der Stallgebäudeumgebung untersucht.

Zu jedem Zeitpunkt wurden folgende Proben gesammelt:

### Stall

- Nullproben (jeweils vor Einstellung der Eintagsküken in den Aufzuchtstall und vor dem Umstallen der wenige Wochen alten Tiere in den Maststall):
  - 1x Einstreu
  - 1x Tränkwasser
  - Umgebungstupfer (Tränken, Tröge, Wände, Absperrungen)
- Tierproben:
  - 20 Kloakentupfer von Einzeltieren
- Tierumgebung:
  - 1x Sammelstaub
  - 1x Sammelkot / Kükenwindeln (bei Einstellung)
  - 1x Sockentupfer
  - 1x Futter (direkt aus dem Trog)
  - 1x Tränkwasser
  - 4x Umgebungstupfer (Tränken, Tröge, Wände, Absperrungen)
  - 3x Luftprobe (an drei verschiedenen Stellen, mittels Impinger AGI-30, in 1,50 m Höhe, Luftdurchfluss 11-12 l/min, Probenahmedauer 30 min)

### Stallumgebung

- 2x Luftprobe (mittels Impinger AGI-30, in 1,50 m Höhe, Luftdurchfluss 11-12 l/min, Probenahmedauer 90 min): 100 m Entfernung vom Stall auf Luv-Seite (windzugewandt) und 50 m auf Lee-Seite (windabgewandt)
- 5x Sockentupfer der Bodenoberfläche (Abschreiten einer 50 m langen Strecke): in Entfernung von 100 m auf Luv-Seite und 50 m, 150 m, 300 m, 500 m, 1000 m auf Lee-Seite
- 1x Mistprobe

Dazu wurden neben dem oben erwähnten Fragebogen zudem Daten des Stallklimas sowie des Außenklimas erfasst.

## **2.3. Labordiagnostische Untersuchungen**

### **Mikrobiologische Untersuchung der Proben**

Alle Proben wurden qualitativ auf das Vorhandensein ESBL/AmpC-bildender Enterobakterien und insbesondere *E. coli* untersucht. Dazu wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:10, durch Ermitteln des Probengewichts, in einer Luria/Miller-Bouillon (Carl Roth®, X968.2) mit Hilfe eines Stomachers homogenisiert. Die Umgebungs- sowie Kloakentupfer der Einzeltiere wurden in jeweils 1,5 ml phosphat-gepufferter Lösung (PBS) ausgeschüttelt. Der Tupfer sowie 1 ml PBS wurden in 9 ml Luria/Miller-Bouillon 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 EFSA (EFSA, 2012) zur Selektion ESBL/AmpC-bildender *E. coli* empfohlenes Verfahren und wurde analog auch im Forschungsverbund RESET eingesetzt und gewährleistet somit eine gute Vergleichbarkeit der Projektergebnisse.

Bei ausgewählten Proben (Sammelkot, Kloakentupfer, Sammelstaub) wurde zudem die genaue Anzahl ESBL/AmpC-verdächtiger *E. coli* bestimmt. Dazu wurden bei der Sammelkot- sowie Sammelstaubprobe vor Inkubation 100 µl von verschiedenen Verdünnungsstufen der Bouillon bzw. bei den Kloakentupfern 100 µl Pufferlösung auf je drei Agarplatten MC+ sowie drei MacConkey-Agarplatten ohne Antibiotikumzusatz (MC-) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C aerob inkubiert. Die *E. coli*-Kolonien der Verdünnungsstufe mit 15 bis 300 Kolonien je Platte wurden ausgezählt und die Quantität in koloniebildende Einheiten (KbE) je g bzw. Tupfer berechnet.

Die auf MC+ phänotypisch verschiedenen Kolonien wurden vereinzelt und deren Gattung und Spezies mittels MALDI-TOF bestimmt. Alle *E. coli* sowie darüber hinaus weitere ESBL/AmpC-verdächtige Enterobakterien wurden für weiterführende Untersuchungen kryokonserviert.

### **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 erheben. Dazu wurde zunächst ein Antibiotika-Plättchendiffusionstest nach Methode der CLSI (M02-A11, 2012; M100-S23, 2013) durchgeführt. Folgende

Antibiotikaplättchen wurden verwendet: Cefotaxim 30µg, Cefotaxim+Clavulansäure 30/10µg, Cefoxitin 30µg, Cefepim 30µg, Amoxicillin+Clavulansäure 30 µg, Ceftazidim 30 µg. Die Anwendung erfolgte laut Herstellerangaben (bestbion<sup>dx</sup> GmbH). Eindeutig verdächtige bzw. auch fragliche Isolate wurden anschließend in einer Real-Time-PCR auf das Vorhandensein verschiedener, vorrangig bei Nutztieren vorkommender ESBL- Gene (CTX, SHV, TEM) sowie das AmpC-Gen CMY untersucht (Roschanski et al., 2014).

Bei negativem Ergebnis wurden zwei weitere verdächtige Isolate jeder Spezies aus der Probe wie beschrieben analysiert.

Bei positivem Ergebnis erfolgte die Sequenzierung der gefundenen Gene. Dafür mussten erneut weitere PCR-Reaktionen, bis zu fünf bei vorher detektiertem CTX-M-Gen (Batchelor et al., 2005; Carattoli et al., 2008; Chmelnitsky et al., 2005; Hopkins et al., 2006; Ruiz del Castillo et al., 2013) und je eine bei allen anderen Genen (Olesen et al., 2004; Projahn, 2016; Weill et al., 2004), durchgeführt werden. Dies ist beim alleinigen

Nachweis von SHV oder TEM zur Bestätigung des ESBL-Status nötig, da nicht alle Enzymtypen den ESBLs zugeordnet werden. Bei CTX-M sowie CMY dient es der Spezifizierung des Gens, was bei heutiger Datenlage notwendig für den Vergleich zu anderen Studien und daraus sich ergebenden epidemiologischen Rückschlüssen ist. Ein Isolat und somit auch die dazugehörige Probe wurden ESBL/AmpC-positiv gewertet, wenn diese im Antibiotika-Plättchendiffusionstest phänotypisch verdächtig waren und ein ESBL/AmpC-Gen via PCR und Sequenzierung nachgewiesen wurde.

## **2.4. Statistik**

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

Die Prävalenz des Betriebsstatus in den Putenmastbetrieben wurde mit der beim Masthähnchen, Schwein und Rinder mit Hilfe des 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 innerhalb der Querschnittstudie der Putenbetriebe vorliegen, wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests beantwortet.

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 Modell ermittelt, wobei der Herkunftsbetrieb als zufälliger Effekt in das Modell einbezogen wurde, da z.T. mehrere quantifizierte Proben aus dem selben Betrieb stammten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

##### 3.1.1. Querschnittstudie

###### *Allgemeine Betriebsdaten*

Bei 48 Betrieben wurde im Rahmen der Querschnittstudie deren ESBL/AmpC-Status bestimmt. Die Betriebsdaten sind in Tabelle 4 zusammengefasst. In 44 von 48 Betrieben wurde jeweils eine Aufzuchttherde und eine Masttherde parallel beprobt. Bei vier Betrieben war nur eine Altersgruppe im Betrieb vorhanden und so konnten in drei Betrieben jeweils nur die Masttherde, bei einem Betrieb nur die Aufzuchttherde untersucht werden.

**Tabelle 4: Übersicht der Betriebsdaten der 48 Putenmastbetriebe der Querschnittstudie**

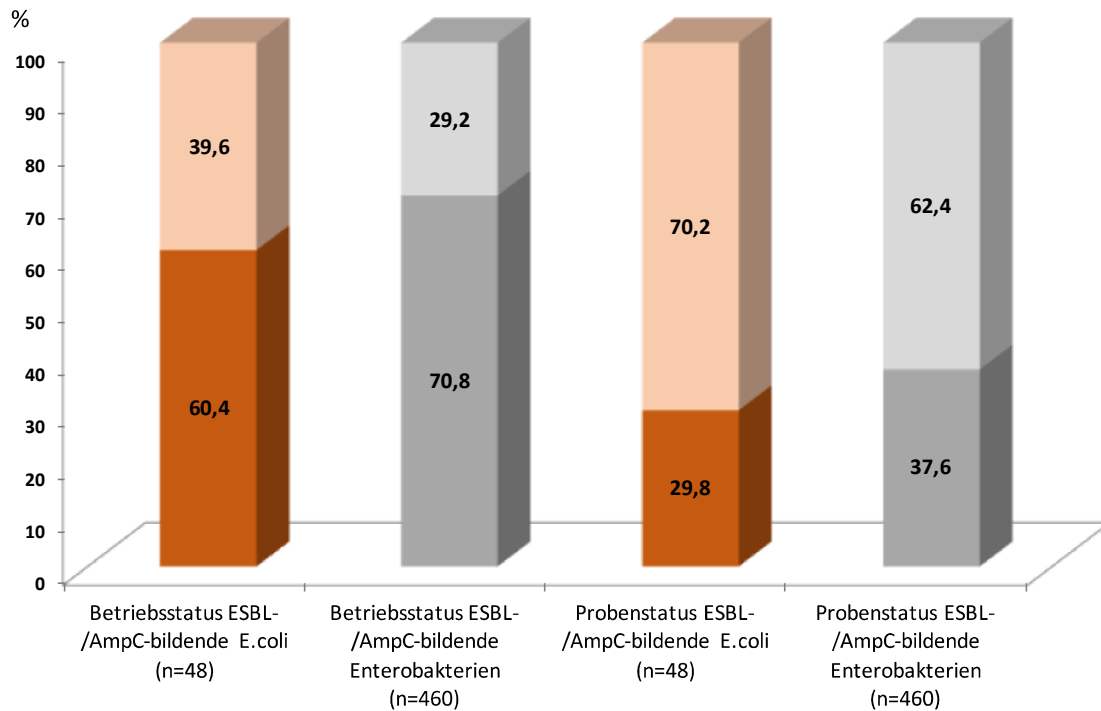
	Tierzahl im Betrieb	Tierzahl der untersuchten Aufzuchttherde	Tierzahl der untersuchten Masttherde	Tieralter in Tagen der untersuchten Aufzuchttherde	Tieralter in Tagen der untersuchten Masttherde
Median	23.000	10.740	4.500	11	126
Minimum	8.000	4.120	350	1	50
Maximum	66.000	28.000	8.500	51	147

###### *ESBL/AmpC-Status der Betriebe und Proben*

In jeden Betrieb wurden insgesamt zehn Proben untersucht. Eine Ausnahme stellten die vier Betriebe mit nur einer Altersgruppe dar, bei welchen lediglich fünf Proben analysiert wurden. Bei mindestens einer positiven Probe im Betrieb wurde diesen ein positiver ESBL/AmpC-Status zugeschrieben.

Von allen 48 untersuchten Betrieben hatten 70,8 % einen positiven Status für ESBL/AmpC-produzierende Enterobakterien, eingeschlossen *E. coli* (graue Balken), und 60,4 % für ESBL/AmpC-*E. coli* (rote Balken). Dies ist in Abbildung 1 dargestellt.

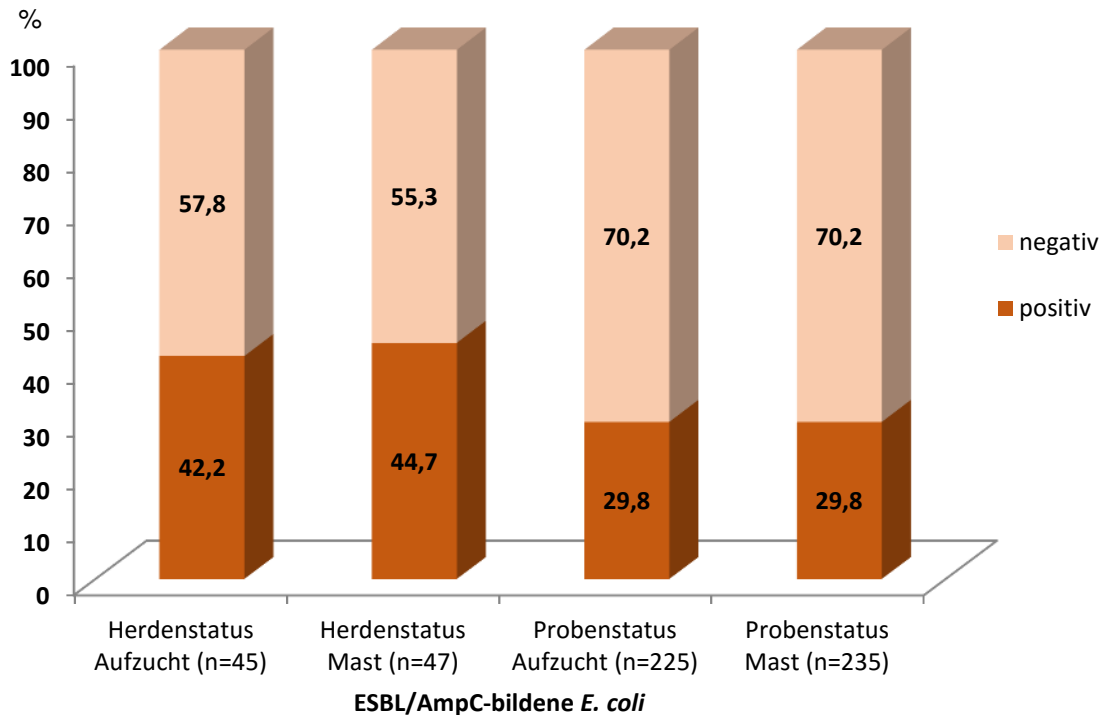
Betrachtet man die ESBL/AmpC-Prävalenzen auf Probenebene ergeben sich Nachweisraten von 37,6 % ESBL/AmpC-positive Proben bezüglich Enterobakterien und 29,8 % bezüglich *E. coli*.



**Abbildung 1: Anteil ESBL-/AmpC-positiver Betriebe bzw. Proben von 48 Betrieben und 460 Proben (dunkle, untere Balkenabschnitte stellen die ESBL/AmpC-positiven Anteile dar)**

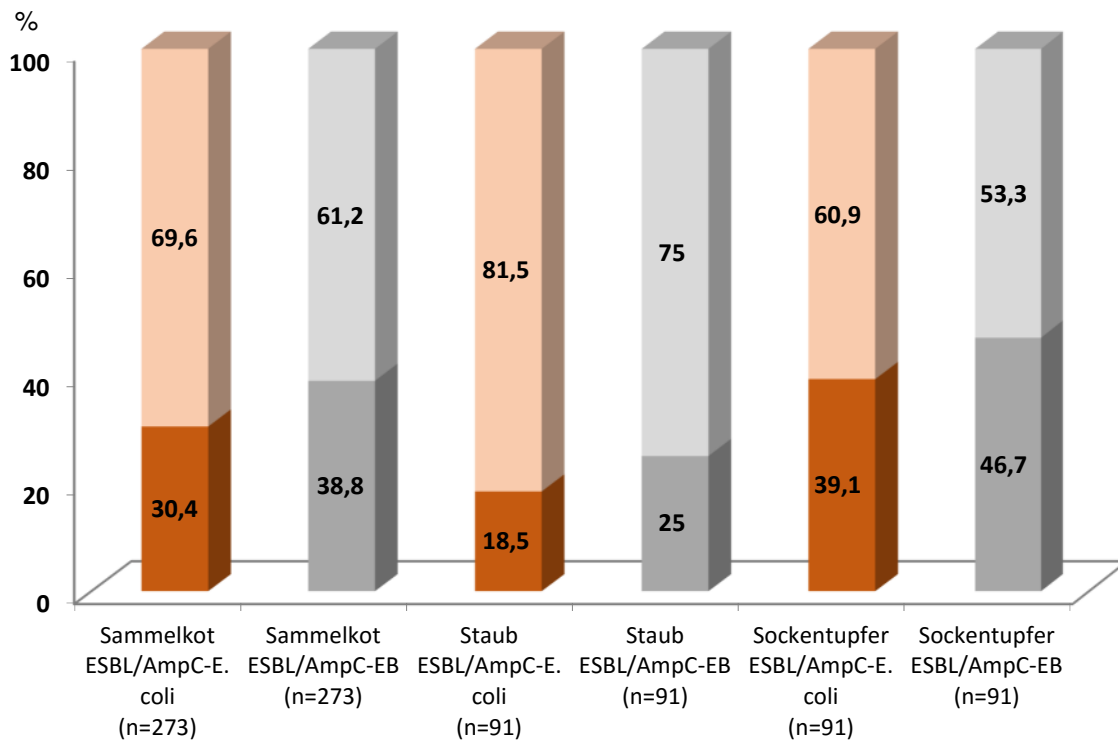
Eine weitere Fragestellung des Projekts war es, das Vorkommen der resistenten Bakterien bei den unterschiedlich alten Tieren (Aufzuchtherde und Mastherde) zu untersuchen. Wie in Abbildung 2 dargestellt ergaben sich dabei weder bei dem ESBL/AmpC-Status der Betriebe noch bei der Anzahl ESBL/AmpC-positiver Proben signifikante Unterschiede.





**Abbildung 2: Vergleich von Betriebs- und Probenstatus von Aufzucht- und Mastherden bezüglich ESBL-/AmpC-bildender *E. coli***

Ein weiterer Aspekt ist das verschiedene Probenmaterial, welches für die Bestimmung des ESBL/AmpC-Status verwendet wurde. Dabei wurde der Sockentupfer mit 46,7 % bzw. 39,1 % am häufigsten positiv für ESBL/AmpC- Enterobakterien bzw. ESBL/AmpC-*E. coli* getestet, dicht gefolgt von der Sammelkotprobe (Abbildung 3). Die drei Probenmatrizes unterschieden sich dabei nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test,  $p > 0,05$ ). Mit den höchsten Nachweisraten ist der Sockentupfer eine sehr gut geeignete Probe zur Bestimmung des ESBL/AmpC-Status eines Putenmastbetriebes, welche zudem schnell und einfach im Tierstall zu nehmen ist.



**Abbildung 3: Anteil ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* sowie ESBL/AmpC-Enterobakterien (EB) in verschiedenen Probenmatrizes (dunkle, untere Balkenabschnitte stellen die ESBL/AmpC-positiven Anteile dar)**

### **Quantifizierung ESBL/AmpC-*E. coli* und Vergleich zu Gesamt-*E. coli***

Jeweils die erste von drei Sammelkotproben jeder Altersgruppe sowie jede Staubprobe wurde hinsichtlich der Anzahl ESBL/AmpC-bildender *E. coli* sowie Gesamt-*E. coli* untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 gezeigt. Dabei wurde der geometrische Mittelwert von allen hinsichtlich ESBL/AmpC-*E. coli* quantifizierbaren Proben ermittelt. Negative oder ausschließlich über das Anreicherungsverfahren ESBL/AmpC-positive Proben wurden in der Berechnung nicht berücksichtigt.

Tabelle 5: Anzahl ESBL/AmpC-bildender *E. coli* und Gesamt-*E. coli*

	<i>E. coli</i> in KbE/g $\bar{x}$ -geom	
	Sammelkot	Staub
<b>Aufzuchtherden</b>		
MC+	1,2E+06 (n=16)	2,4E+02 (n=11)
MC-	1,1E+08 (n=16)	2,2E+04 (n=11)
Anteil ESBL-/AmpC-verdächtige <i>E. coli</i> an Gesamt- <i>E. coli</i>	1,09 %	1,09 %
<b>Mastherden</b>		
MC+	5,8E+04 (n=16)	7,0E+02 (n=8)
MC-	5,2E+07 (n=16)	1,8E+04 (n=8)
Anteil ESBL-/AmpC-verdächtige <i>E. coli</i>	0,11 %	3,89 %
<b>GESAMT</b>		
MC+	2,6E+05 (n=32)	3,8E+02 (n=19)
MC-	7,7E+07 (n=32)	2,0E+04 (n=19)
Anteil ESBL-/AmpC-verdächtige <i>E. coli</i>	0,34 %	1,9 %

MC+ = MacConkey-Agar mit 1 µg/ml Cefotaxim; MC- = MacConkey-Agar ohne Cefotaxim; E = 10<sup>x</sup>

Vergleicht man die beiden Altersgruppen miteinander, fällt auf, dass in den quantifizierbaren Sammelkotproben der Aufzuchtherden mit  $1,2 \times 10^6$  KbE/g mehr ESBL/AmpC-*E. coli* als bei den Mastherden ( $5,77 \times 10^4$  KbE/g) nachweisbar waren. Der einfache t-Test gab Hinweise auf statistisch signifikante Unterschiede, welche in einem gemischten Modell bestätigt werden konnten. In dem Modell wurde der Herkunftsbetrieb als zufälliger Faktor einbezogen, da z.T. mehrere quantifizierte Proben aus demselben Betrieb stammten. Die Keimzahlen für ESBL/AmpC-*E. coli* scheinen also im Mastverlauf zu sinken.

Betrachtet man die ESBL/AmpC-Fraktion an den Gesamt-*E. coli* lassen sich Anteile von 0,34 % bei Sammelkotproben und 1,9 % bei Sammelstaub zeigen. Nur ein Bruchteil aller *E. coli* bilden demnach auch Extended-Spektrum- bzw. AmpC-Beta-Laktamasen.

**Enzym-Typen ESBL/AmpC-verdächtiger Isolate innerhalb der Querschnittstudie**

Für jede ESBL/AmpC-positive Probe wurde ein Isolat jeder Spezies der Familie Enterobakterien zum einen phänotypisch mittels eines Antibiotika-Plättchendiffusionstest untersucht, zum anderen auf das Vorhandensein der ESBL-Gene CTX-M, TEM und SHV sowie des AmpC-Gens 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. Insgesamt wurden im Rahmen der Querschnittstudie bei 137 *E. coli*-Isolaten erfolgreich der Enzymtyp bestimmt. Dabei dominierten mit ca. 88% die CTX-M-Enzyme, welche alle zu den Extended-Spektrum-Beta-Laktamasen zählen Tabelle 6. Unter den CTX-M-Enzymen (n = 121) kamen verschiedene Enzymvarianten vor, wobei CTX-M-1 mit einem Anteil von 47,1 % an allen CTX-M-Enzymen am häufigsten gefunden wurde, gefolgt von CTX-M-14 mit 20,7 %, CTX-M-15 mit 17,3 %, CTX-M-32 mit 7,4 %, CTX-M-27 mit 6,6 % und CTX-M-55 mit 0,8 %. Außer CTX-M wurde die AmpC-Beta-Laktamase CMY-2 bei 9 Isolaten (6,6 %) sowie andere ESBLs wie SHV-2 oder SHV-12 bei 5 (3,6 %) und TEM-52 bei 2 *E. coli*-Isolaten (1,5 %) nachgewiesen. Außerdem kamen auch Enzymkombinationen mit Beta-Laktamasen (keine ESBLs) der TEM-Gruppe, wie TEM-1, TEM-57 oder TEM-135 vor.

Tabelle 6: Enzym-Typen der ESBL/AmpC- *E. coli* der Querschnittstudie

	Enzym-Typ	ESBL/AmpC-positive <i>E. coli</i> von n=137	ESBL/AmpC-positive <i>E. coli</i> in %
<b>CTX-M</b>		<b>121</b>	<b>88,3</b>
	CTX-M-1+TEM-1	37	27
	CTX-M-1	20	14,6
	CTX-M-14	13	9,5
	CTX-M-14+TEM-1	8	5,8
	CTX-M-14+TEM-57	3	2,2
	CTX-M-14+TEM-135	1	0,7
	CTX-M-15+TEM-1	21	15,3
	CTX-M-27	2	1,5
	CTX-M-27+TEM-1	6	4,4
	CTX-M-32+TEM-1	2	1,5
	CTX-M-32	7	5,2
	CTX-M-55+TEM-1	1	0,7
<b>CMY</b>	CMY-2+TEM-1	<b>9</b>	<b>6,6</b>
<b>SHV</b>		<b>5</b>	<b>3,7</b>
	SHV-12+TEM-135	2	1,5
	SHV-12+TEM-1	2	1,5
	SHV-2a	1	0,7
<b>TEM</b>	TEM-52	<b>2</b>	<b>1,5</b>

Andere ESBL/AmpC-verdächtige Enterobakterien, außer *E. coli*, zeigten auch überwiegend CTX-M-Enzyme, jedoch dominierte hier CTX-M-65, welches bei *E. coli* gar nicht gefunden wurde. Zudem traten hier noch vereinzelt SHV-2 sowie CMY-2 auf (Tabelle 7).

Tabelle 7: Enzym-Typen der ESBL/AmpC-Enterobakterien (außer *E. coli*) der Querschnittstudie

	Enzym-Typ	ESBL/AmpC-positive Enterobakterien (außer <i>E. coli</i> ) von n=46	ESBL/AmpC-positive Enterobakterien (außer <i>E. coli</i> ) in %
<b>CTX-M</b>		<b>42</b>	<b>91,3</b>
	CTX-M-65	22	47,8
	CTX-M-65+TEM-2	1	2,2
	CTX-M-15+TEM-1	5	10,9
	CTX-M-15+TEM-1 +SHV-1	3	6,5
	CTX-M-1+TEM-1	3	6,5
	CTX-M-1	3	6,5
	CTX-M-1+TEM-1 +SHV-1	1	2,2
	CTX-M-1+SHV-12	1	2,2
	CTX-M-1+SHV-52	2	4,3
	CTX-M-9	1	2,2
<b>SHV</b>	SHV-2	<b>3</b>	<b>6,5</b>
<b>CMY</b>	CMY-2	<b>1</b>	<b>2,2</b>

### ***Diskussion der Daten der Querschnittstudie***

#### *Vergleich zu Masthähnchen*

Die Daten dieses Projektes sollten v.a. mit den vergleichbaren Querschnittstudien in Masthähnchen-, Mastschwein- und Rinderbetrieben im Rahmen des Forschungsverbundes RESET verglichen werden. Bezüglich der Masthähnchen wurden 59 Herden aus insgesamt 34 Masthähnchenbetrieben auf das Vorkommen von ESBL/AmpC-verdächtigen *E. coli* untersucht, wobei sich eine Herden- sowie Betriebsprävalenz von 100 % ergab (Hering et al., 2016). Das ist deutlich höher als die in dieser Studie erhobene Prävalenz von 60,4 % für ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* in Putenmastbetrieben der verschiedenen Bundesländer (Fisher-Test,  $p < 0,01$ ). Im Gegensatz zu den Masthähnchenbetrieben wurden in diesem Projekt komplett negative Betriebe identifiziert. Die Gründe, dass einige Betriebe einen positiven, andere einen negativen Status aufwiesen, waren nicht offensichtlich. Dazu erfolgt

daher derzeit eine detaillierte Auswertung der Fragebögen, so dass ggf. potentielle Risikofaktoren für einen positiven Status herausgefunden werden können. Dies erfordert die Einbeziehung aller Projektdaten und –ergebnisse in einem komplexen statischen Modell.

Analog dazu waren die Nachweisraten der verschiedenen Probenarten in den untersuchten Masthähnchenbetrieben mit 82 % positive Sammelkotproben ( $n = 177$ ), 80 % positive Sockentupferproben ( $n = 59$ ) und 63 % positive Sammelstaubproben ( $n = 59$ ) auch deutlich 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,  $p < 0,01$ ).

Hinsichtlich der detektieren ESBL/AmpC-Gene in den verdächtigen *E. coli*-Isolaten war im Gegensatz zu den Puten, bei denen überwiegend CTX-M-ESBLs gefunden wurden, bei den Masthähnchen-Isolaten aus dem RESET-Verbund vor allem das CMY-Gen sowie SHV-12 dominierend, gefolgt von CTX-M-1 und TEM-52 (interne Daten des RESET-I-Verbundes). Dies bedeutet eventuell, dass die ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* von Masthähnchen und Puten epidemiologisch verschieden sind. Für valide Aussagen dazu sind allerdings weitere Untersuchungen u.a. wie die Bestimmung der phylogenetischen Gruppe und des Sequenztyps notwendig.

#### *Vergleich zu Mastschweinen*

Auch die Prävalenz in 48 untersuchten Schweinemastbetrieben war mit 85,4 % ESBL/AmpC-verdächtigen Betrieben signifikant höher als bei den hier untersuchten Putenbetrieben (Fisher-Test,  $p < 0,01$ ) (Hering et al., 2014). Die Nachweisraten in den einzelnen Probenarten waren bei Sammelkot mit 61,5 % verdächtigen Proben und Sockentupfer mit 54,2 % auch höher (Fisher-Test,  $p < 0,01$  für Sammelkot bzw.  $p < 0,05$  bei Sockentupfer), beim Sammelstaub mit 10,5 % ähnlich (Fisher-Test,  $p > 0,05$ ) wie bei den hier untersuchten Putenmastbetrieben. Warum bei den Masthähnchenhaltungen die Prävalenz der resistenten Bakterien im Staub höher ist im Vergleich zu den Schweinemast- und auch Putenmastbetrieben, ist nicht klar. In Masthähnchenhaltungen wird permanent sehr viel Staub produziert, der auch zu einem großen Teil aus Federstaub, Einstreu und Kotpartikeln besteht. Beim Schwein hingegen fällt weniger Staub an, der vor allem aus Futterstäuben besteht und bei der Sammlung wahrscheinlich auch schon länger abgelagert war. 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, was allerdings in systematischen Laborstudien näher untersucht werden müsste.

Die Enzymtypen waren bei den ESBL/AmpC-Isolaten der Mastschweinebetriebe fast ausschließlich CTX-M-1, welche auch in den Putenhaltungen vorrangig zu finden waren. Nur wenige Schweinemast-Isolate wiesen CTX-M-9, 14, 15, 24, TEM-52, SHV-12 oder CMY-2 auf.

#### *Vergleich zu Rindern*

Bei 45 in Bayern untersuchten Rinderbetrieben lag die Betriebsprävalenz für ESBL-bildende *E. coli* bei 86,7 %, also ebenfalls 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,  $p > 0,05$ ). 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.

### **3.1.2 Longitudinalstudie**

Im Rahmen der Longitudinalstudie wurden sieben Putenmastbetriebe mit vorher bestätigtem positiven ESBL/AmpC-Status dreimalig intensiv untersucht. Tabelle 8 fasst einige Daten der Studienbetriebe zusammen.



**Tabelle 8: Übersicht zu den untersuchten Putenmastbetrieben im Rahmen der Longitudinalstudie**

Betriebsnummer	Tierzahl gesamter Betrieb	1. Probenahme (Datum,Temp.,LF) Alter, Tiere in Herde Antibiotika/Beta-Laktam-Behandlung	2. Probenahme (Datum,Temp.,LF) Alter, Tiere in Herde Antibiotika/Beta-Laktam-Behandlung	3. Probenahme (Datum,Temp.,LF) Alter, Tiere in Herde Antibiotika/Beta-Laktam-Behandlung	Geschlecht
1	26.000	03.04.14, 4°C, 83% 1 d, 5.600 -/-	26.05.14, 28°C, 41% 54 d, 2.700 +/+	15.07.14, 23°C, 58% 104 d, 2.580 +/+	weiblich
2	23.000	15.04.14, 10°C, 48% 1 d, 6.000 -/-	16.06.14, 21°C, 48% 63 d, 2.000 +/-	08.09.14, 22°C, 55% 147 d, 1.850 +/+	männlich
3	20.200	29.08.14, k.A. 1 d, 13.270 -/-	03.11.14, 16°C, 73% 67 d, 4.900 +/+	08.12.14, 4°C, 74% 102 d, 4.900 +/+	weiblich
4	20.000	07.11.14, 10°C, 65% 1 d, 10.900 -/-	21.01.15, 1°C, 74% 76 d, 3.300 +/+	24.03.15, 11°C, 43% 138 d, 3.300 +/+	männlich
5	50.000	09.03.15, 14°C, 57% 3 d, 5.660 -/-	06.05.15, 17°C, 52% 61 d, 1.500 k.A.	09.07.15, 15°C, 74% 125 d, 1.500 +/+	männlich
6	11.600	12.03.15, 11°C, 54% 1 d, 7.000 -/-	12.05.15, 21°C, 53% 62 d, 4.000 +/+	20.07.15, 21°C, 47% 131 d, 4.000 +/+	männlich
7	20.000	18.03.15, 15°C, 36% 1 d, 11.000 -/-	20.05.15, 15°C, 50% 64 d, 4.000 +/+	23.07.15, 20°C, 54% 128 d, 4.000 +/+	männlich

LF = Luftfeuchte, + = Antibiotikaaanwendung erfolgt, - = keine Antibiotikaaanwendung, k.A. = keine Angabe

Die detaillierten Ergebnisse für die einzelnen Betriebe zeigen Tabelle 9 für die Untersuchungen der Tiere sowie der Tierumgebung im Stall und Tabelle 11 für die Untersuchungen der Stallumgebung sowie dafür relevante Stallproben (Staub und Luft). Jeder Betrieb wurde zur Einstallung der Eintagsküken (Zeitpunkt 1), zur Mastmitte (Zeitpunkt 2) sowie zum Ender der Mast (Zeitpunkt 3) untersucht.

Tabelle 9: ESBL-/AmpC-bildende *E.coli* in verschiedenen Proben im Stall sowie der Einzeltieruntersuchungen innerhalb der Longitudinalstudie zu drei verschiedenen Zeitpunkten (1, 2, 3)

Betrieb	Umgebungstupfer (n=4) in %			Tränkwasser			Futter			Sockentupfer Stall			Kükenwindel/ Sammelkot			Kloakentupfer (n=20) in %			Nullproben	
	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 <sup>#</sup>	-	25	25	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	100	50	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	60	5	-	-
7	-	25	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	95	10	-	-
<b>Gesamt in %</b>	-	18	11	-	57	57	-	57	57	14	100	71	-	100	57	-	56	33	-	14

Umgebungstupfer schließen Wände, Futtertröge, Tränken sowie Rohre/Absperrungen etc. ein.

\*01=Nullprobe vor Einstellung der Küken, 02= Nullprobe vor Umstallung in 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, bis auf eine Ausnahme, 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 bei der Beprobung bereits 3 Tage alt. Erwähnenswert sind die negativen Ergebnisse der frisch eingestellten Küken sowie der Kükenwindeln (Papier aus den Transportboxen der Küken). Dies weist darauf hin, dass die resistenten Bakterien nicht vorrangig durch die Tiere in den Betrieb eingeschleppt werden. Alle anderen Proben im Stall sowie die Nullproben, welche vor Einstallung entnommen wurden, waren jedoch auch negativ, so dass auch nicht davon auszugehen ist, dass größere Erregermengen bereits bei Einstallung im Stall vorhanden waren. Dabei ist jedoch die limitierte Probenanzahl und auch das Detektionslimit zu berücksichtigen, da zu diesem frühen Zeitpunkt ggf. die Erregerlast noch sehr gering ist und man dadurch evtl. trotz des in der Studie angewandten, sehr sensitiven Verfahrens die resistenten Bakterien nicht detektieren konnte.

**Zum Zeitpunkt der zweiten Beprobung** zur Mastmitte waren die Tiere bereits vom Aufzuchtstall in den Maststall verbracht. 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 11) 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 11). 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. Dies bedeutet, dass hier die Tiere in eine kontaminierte Umgebung gebracht wurden und spätestens in diesem Maststall die Wahrscheinlichkeit einer Kolonisierung der Tiere mit den resistenten *E. coli* sehr hoch war.

**Zum Zeitpunkt der dritten Beprobung** zum Mastende wiesen zwei Betriebe (Nr. 1 und 4) einen komplett negativen ESBL/AmpC-Status auf. 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 % positive 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. Hier scheint 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 worden zu

sein. Die in Tabelle 10 aufgeführten quantitativen Untersuchungen zeigen zudem, dass in Betrieb 1 lediglich drei von acht positiven Kloakentupfern auch quantifizierbar waren und dabei geringe Keimzahlen aufwiesen. Dies deutet schon auf eine sehr schwache Kolonisierung der Tiere hin. Bei 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. Trotzdem 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-Bilder 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 (Daten nicht dargestellt).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Resistenzlage über die Länge der Mastdauer, welche bei weiblichen Puten ca. 16 bis 17 und bei den männlichen Tieren ca. 20 bis 21 Wochen beträgt, in verschiedene Richtungen entwickeln kann. Eine Begründung für das scheinbare Verschwinden der resistenten Bakterien bei zwei Betrieben ist derzeit schwierig. Man könnte eine unterschiedliche Anwendung von Antibiotika in den Betrieben vermuten. Wie Tabelle 8 zu entnehmen haben alle Betriebe zum zweiten und auch zum dritten Untersuchungszeitpunkt Antibiotika, bis auf eine Ausnahme einschließlich Beta-Laktam-Antibiotika, eingesetzt. Es fielen auch 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 liefern.

**Tabelle 10: Anzahl ESBL/AmpC-bildender *E. coli* und Gesamt-*E. coli* in Einzeltier-Kloakentupfer der sieben Betriebe der Longitudinalstudie zu den verschiedenen Zeitpunkten**

Betrieb	Zeitpunkt 2			Zeitpunkt 3		
	<i>E. coli</i> in KbE/g x̄geom		Anteil ESBL-/AmpC- verdächtige <i>E. coli</i> an Gesamt- <i>E. coli</i> in %	<i>E. coli</i> in KbE/g x̄geom		Anteil ESBL-/AmpC- verdächtige <i>E. coli</i> an Gesamt- <i>E. coli</i> in %
	MC+	MC-		MC+	MC-	
1	1,36E+02 (n=3)	9,56E+05 (n=3)	0,01	-	-	
2	1,63E+03 (n=16)	1,32E+05 (n=16)	1,24	1,54E+04 (n=18)	4,61E+05 (n=18)	3,34
3	-	-		5,51E+02 (n=3)	1,91E+05 (n=3)	0,29
4	-	-		-	-	
5	2,64E+04 (n=20)	1,26E+05 (n=20)	20,90	6,36E+02 (n=2)	2,90E+05 (n=2)	0,22
6	1,72E+04 (n=9)	2,76E+05 (n=9)	6,23	-	-	
7	3,54E+03 (n=14)	1,20E+05 (n=14)	2,96	5,61E+02 (n=4)	1,82E+04 (n=4)	3,08
<b>GESAMT</b>	5,96E+03 (n=62)	1,56E+05 (n=62)	3,82	5,14E+03 (n=27)	2,50E+05 (n=27)	2,06

MC+ = MacConkey-Agar mit 1 µg/ml Cefotaxim; MC- = MacConkey-Agar ohne Cefotaxim; \*Anzahl quantifizierbarer Kloakentupfer

Tabelle 11 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 11: 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 Longitudinalstudie**

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	o
4	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	o/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-
5	-/-	-/-	-/o	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	o	o
6	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	o/-	-/-	-/-	-/-	-/-	o
7	-/-	-/o	-/o	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	o	o

Die drei Zeitpunkte (1, 2, 3 in Tabelle 9) 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. 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 Bakterienkonzentration 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. So wurden bspw. bei Betrieb 3 durch die zum Untersuchungszeitpunkt vorherrschende jeweils identische Windrichtung zu allen Zeitpunkten die gleichen Bodenoberflächen (Feld) beprobt mit unterschiedlichem Ergebnis. So waren auch bei der Probenahme im Dezember bei 4°C ESBL/AmpC-positive Oberflächen zu finden. Bei Betrieb 4 wiederum, bei dem nur zum Zeitpunkt 1 alle Bodenoberflächen positiv waren, war die Windrichtung bei jeder Probenahme verändert und somit auch die Stellen der Probenahmen. Dem Austrag über die Stallabluft ist demnach aber keine größere Rolle zuzuschreiben. Es wird zwar im Staub von vier Betrieben der Langzeitstudie sowie in 18,5 % aller Staubproben der Querschnittstudie gefunden und somit ist auch ein potentieller Austrag mit dem Staub über die Lüftung möglich, es handelt sich jedoch höchstwahrscheinlich um eher geringe Keimmengen, was die quantitativen Ergebnisse der Staubproben der Querschnittstudie (Tabelle 5) untermauern. Damit könnte es sein, dass das Detektionslimit der Luftprobe (9 KbE/m<sup>3</sup> für die Stallluft und 3 KbE/m<sup>3</sup> für die Außenluft) nicht erreicht wird. Dies kann ein Grund für die negativen Luftproben sein, hinzu kommt der auf die geringe Erregerzahl einwirkende Sammelstress bei der Luftprobenentnahme.

Auch alle phänotypisch verdächtigen *E. coli*-Isolate mit positivem PCR-Ergebnis aus der Longitudinalstudie wurden hinsichtlich des genauen ESBL/AmpC-Typs sequenziert. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 12 gezeigt.



Tabelle 12: Enzym-Typen der ESBL/AmpC- *E. coli* der Longitudinalstudie

Betrieb	Zeitpunkt Probenahme	Enzym-Typ	ESBL/AmpC-positive <i>E. coli</i> (n=198)	Probenart im Stall	Probenart der Stallumgebung
1	2	CTX-M32	11	STs, UT, KT, SK, Fu	ST50 <sub>LEE</sub>
		CTX-M32 + TEM-1	1	KT	
	3	CTX-M32	1		Mi
2	2	CTX-M32	24	STs, UT, KT, SK, SS, TW, Fu	
	3	CTX-M14	23	STs, KT, SK, SS, Fu	Mi
		CTX-M14 + TEM-1	1	TW	
3	1	SHV-12 + TEM-1	1		St50 <sub>LEE</sub>
		SHV-12 + TEM-135	1		St100 <sub>LUV</sub>
	2	CTX-M15	1	STs	
		CTX-M15 + TEM-135	1	SK	
		SHV-12 + TEM-135	2	KT	St100 <sub>LUV</sub>
	3	CTX-M15	17	KT, SK, SS, Fu	
		CTX-M15 + TEM-135	5	KT, TW	
		SHV-12 + TEM-135	1	KT	
SHV-12		1		St50 <sub>LEE</sub>	
4	1	CTX-M15	5		Mi, ST50 <sub>LEE</sub> , ST150 <sub>LEE</sub> , ST300 <sub>LEE</sub> , ST1000 <sub>LEE</sub>
		CTX-M15 + TEM-135	2		St100 <sub>LUV</sub> , ST500 <sub>LEE</sub>
	2	CTX-M15	5	STs, UT, KT, SK, TW	
5	1	CTX-M1 + TEM-1	1	STs	
	2	CTX-M1	29	STs, UT, KT, SK, SS, TW, Fu, ES-O, UT2-0	ST50 <sub>LEE</sub>
	3	CTX-M1	16	STs, UT, KT, SK, TW, Fu	ST100 <sub>LUV</sub>

Betrieb	Zeitpunkt Probenahme	Enzym-Typ	ESBL/AmpC-positive <i>E. coli</i> (n=198)	Probenart im Stall	Probenart der Stallumgebung
6	2	CTX-M1	12	STs, KT, SK	
		CTX-M-1 + TEM-1	2	KT	
	3	CTX + TEM-1	2	STs, KT	
7	2	CTX-M-1	16	UT, KT, TW, Fu	St100 <sub>LUV</sub> , ST50 <sub>LEE</sub>
		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	

SK = Sammelkot, KT = Kloakentupfer, UT = Umgebungstupfer, TW = Tränkwasser, Fu = Futter, Mi = Mist, STs= Sockentupfer Stall, ST50/150/500/1000<sub>LEE</sub> = Sockentupfer Lee-Seite Stallumgebung, ST100<sub>LUV</sub> = Sockentupfer Luv-Seite Stallumgebung, ES-0 = Einstreu vor Einstellen in Maststall, UT2-0 = Tupfer Tröge vor Einstellen in Maststall

Es wurden vorrangig ESBLs vom Typ CTX-M gefunden, häufig in Kombination mit einem 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 Tabelle 12 zu entnehmen, 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 evtl. initial negativen Tieren durch die verschmutzte Umgebung. Legt man den Fokus auf die Kontamination der Bodenoberflächen um das Stallgebäude, sieht man in allen Betrieben, bei denen auch ESBL/AmpC-positive Bodenoberflächen vorhanden waren (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 viele Bodenoberflächen mit ESBL-bildenden *E. coli* vom Typ CTX-M-15 kontaminiert waren, jedoch keine positive Stall-Proben nachzuweisen

waren, findet man genau diesen Typ zum Zeitpunkt 2 in den verschiedenen Proben innerhalb des Stalls wieder. Dies könnte auf einen Eintrag der resistenten Bakterien durch die Umgebung in den Stall über die Zeit hindeuten. 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. Ähnlich verhält es sich im Betrieb 3 für Isolate der Gen-Kombination SHV-12+TEM-135. Hier tauchen in Isolaten aus dem Stall jedoch noch zusätzlich ESBL-*E. coli* vom Typ CTX-M auf, die nicht in der Stallgebäudeumgebung gefunden wurden. Die Daten zeigen, dass sowohl ein Ein- als auch ein Austrag von ESBL/AmpC-*E. coli* in bzw. aus Putenmastställen möglich scheint. 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. Als Einschleppungswege kommen kontaminierte Geräte, welche stallübergreifend benutzt werden, wie Einstreumaschinen, Werkzeuge ect., Personal oder auch Staub in Frage. Diese Risikofaktoren werden derzeit noch genauer in einem epidemiologischen Modell ausgewertet.

### ***Diskussion der Daten der Longitudinalstudie***

Beim Masthähnchen, für welche vergleichbare Daten im Rahmen des RESET-I-Forschungsverbundes erhoben wurden, lagen die Einzeltierprävalenzen zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten 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). 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. Vergleichbar verhielt es sich beim Mastschwein. Hier nahm die Einzeltierprävalenz von der ersten Probenahme, kurz nach Einnistung der ca. acht Wochen alten Tiere aus dem Aufzuchtbetrieb, zur 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.

Ein besonderes Ergebnis der Langzeitstudie bei Masthähnen waren ESBL/AmpC-*E. coli*-positive, frisch eingestellte Küken (Alter 1-3 Tage) in sechs von sieben Betrieben. Auch waren die Tierumgebungsproben aus dem Stall zu diesem frühen Untersuchungszeitpunkt schon ESBL/AmpC-positiv. Dies war in keinem der hier untersuchten Mastputenbetrieben

der Fall. Es ist also davon auszugehen, dass die eingestellten Tiere nicht bzw. sehr niedrig belastet sind, so dass sie ggfs. mit der hier angewandten Probenahme- sowie Labormethode nicht identifiziert werden können. Beides wurde jedoch identisch zu der Studie in Masthähnchen- und Mastschweinebetrieben durchgeführt.

Bezüglich der Umgebungsproben der Stallgebäude wurde auf den Bodenoberflächen um sechs von sieben Masthähnchenbetrieben ESBL/AmpC-*E. coli* 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 sowie auch einige Stallluft- und Abluftproben, was einen Austrag über den fäkalen und, wenn auch hier wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung, luftgetragenen Weg annehmen lässt. Beim Mastschwein war ein Betrieb komplett ESBL/AmpC-negativ bei der Untersuchung der umliegenden Bodenoberflächen, bei allen anderen waren die Proben vereinzelt positiv, vergleichbar zu den Putenmastbetrieben aus dieser Studie. Auch waren die überwiegende Zahl der Gülleproben ESBL/AmpC-positiv. Im Kontrast zu den Putenbetrieben wurden auch in den Schweinemastbetrieben einige Stallluftproben sowie auch zwei Außenluftproben positiv auf ESBL/AmpC-*E. coli* getestet. Staub war hingegen bei den Mastschweinbetrieben stets negativ. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Stallumgebungsproben der Putenmastbetriebe sehr niedrig belastet waren, da die wenigen positiven Proben nicht quantifiziert werden konnten.

Die Herkunft der ESBL/AmpC-*E. coli* und der genaue Weg der letztlich zu zum Teil hochprävalenten Herden zum Mastende führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Weder die Eintagsküken noch ein initial kontaminierter Stall konnten eindeutig als Quelle identifiziert werden. Eine intensivierete Probenahme mit erhöhter Anzahl von Proben und mehrmaliger Beprobung in den ersten Lebenstagen der Tiere könnte Aufschluss darüber geben wo die resistenten Erreger zuerst zu detektieren sind. Eine ggf. zusätzliche Einschleppung der ESBL/AmpCs über die kontaminierte Umgebung des Stalls bzw. des Betriebsgeländes über die Zeit der Mast scheint zudem sehr wahrscheinlich.

### **3.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Die Ergebnisse, welche im Projekt generiert wurden, liefern die notwendigen Erkenntnisse zur Erfüllung des Entscheidungshilfebedarfs. Die Prävalenz von ESBL/AmpC-*E. coli* in deutschen Putenmastbetrieben wurde systematisch und valide erhoben. Sie liegt mit 60,4 % ESBL/AmpC-*E. coli*-positiven Betrieben signifikant unter der Prävalenz anderer untersuchter

Nutztierhaltungen wie Masthähnchen-, Schweinemast- und Rinderbetrieben. Die resistenten Bakterien sind aber dennoch in vielen Putenmastbetrieben zu finden. Die weitere Auswertung der im Projekt erhobenen Betriebsdaten gibt ggf. weitere Informationen zu potenziellen Risikofaktoren.

Des Weiteren liefern die Ergebnisse der Longitudinalstudie Erkenntnisse zu Ein- und Austragswegen der ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in bzw. aus Putenmasthaltungen. Dies ist wichtig für die Festlegung von potenziellen Interventionsmaßnahmen zur Minimierung der ESBL/AmpC-Prävalenz wie die Sicherstellung einer bestmöglichen Stalldesinfektion, Prävention der Kontamination der Stallgebäudeumgebung sowie die Vermeidung der Bakterienverschleppung innerhalb des Betriebs.

Die Erfassung der genauen ESBL/AmpC-Typen erlaubt zudem vergleichende Analysen zu ESBL/AmpC-*E. coli* bei anderen Tierarten. Dies lässt zum einen Rückschlüsse auf die Variabilität der resistenten Bakterien innerhalb der Spezies Pute, zum anderen auch vergleichende Analysen zu anderen Tierarten, zu.

## 4. Zusammenfassung

Ziel dieses Projektes war die Erfüllung eines Entscheidungshilfebedarfes des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft, wissenschaftliche Untersuchungen zum Vorkommen von Extended-Spektrum-Beta-Laktamase (ESBL) bzw. AmpC-Beta-Laktamase - bildenden *Escherichia (E.) coli* bei Mastputen, zu möglichen Ein- und Austragsquellen und zur Bedeutung von Mastgeflügel in der ESBL-Problematik durchzuführen.

Dabei wurden im Rahmen einer Querschnittstudie 48 konventionelle Putenmastbetriebe deutschlandweit untersucht. Die geographische Verteilung der in die Studie aufgenommenen Betriebe richtete sich nach der Anzahl der in den verschiedenen Bundesländern gehaltenen Puten. In 44 von 48 Betrieben wurde in einer Aufzuchttherde (Median Alter: 11 Tage) und parallel in einer Masttherde (Median Alter: 126 Tage) drei Sammelkot-, eine Sockentupfer- sowie eine Staubprobe gesammelt und auf ESBL/AmpC-bildende *E. coli* untersucht. Insgesamt wiesen 60,4 % (29/48) der Betriebe einen positiven Status für ESBL/AmpC-*E. coli* auf, was bedeutet, dass mindestens eine der Proben positiv getestet wurde. Bezüglich der verschiedenen Probenarten waren der Sockentupfer mit 39,1 % (36/92) sowie die Sammelkotprobe mit 30,4 % (83/276) etwas häufiger positiv als die Staubproben mit 18,5 % (17/92). Bei der Bestimmung der genauen Enzymtypen der ESBL/AmpC-*E. coli* war der CTX-M-Typ mit 88,3 % (121/137) dominierend, wobei darunter am häufigsten CTX-M-1 (n = 57), gefolgt von CTX-M-14 (n = 25), CTX-M-15 (n = 21) und wenige Isolate mit den Typen CTX-M-27, M-32 und M-55 vorkamen. Zusätzlich wurden vereinzelt die Typen CMY-2, SHV-2a, SHV-12 sowie TEM-52 gefunden. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den Masthähnchenbetrieben, bei welchen zum einem die Betriebsprävalenz höher lag und zum anderen vorrangig der Enzymtyp CMY bei den resistenten Isolaten nachgewiesen wurde.

Im Rahmen der Longitudinalstudie wurden sieben Putenmastbetriebe mit vorher bestätigtem positivem ESBL/AmpC-Status dreimalig, zum Einstellen der Küken, zur Mastmitte und zum Mastende intensiv (Einzeltiere, Tierumgebung, Stallumgebung) untersucht. Dabei waren zur Einnistung der Tiere alle Proben von Tieren und direkter Tierumgebung ESBL/AmpC-negativ. Dies zeigt, dass weder die Tiere nachweisbare resistente Bakterien mitzubringen scheinen, noch, dass der Stall

selbst so kontaminiert war, dass durch die in dieser Studie angewandte, hochsensitive Probenahme und –bearbeitung diese auffindbar waren. Im weiteren Verlauf hingegen, reicherten sich zur Mastmitte hin ESBL/AmpC-*E. coli* bei den Tieren und in deren Umgebung an und waren regelmäßig in allen Betrieben zu finden. Zum Mastende wiederum, wiesen zwei Betriebe einen komplett negativen ESBL/AmpC-Status auf. In drei Betrieben sank die Einzeltierprävalenz, ein Betrieb blieb weitestgehend unverändert und bei einem anderen stiegen die Nachweishäufigkeiten. Eine Begründung für die unterschiedlichen Verläufe der Resistenzlage ist derzeit noch schwierig. Bei der Untersuchung der Stallumgebung (Bodenoberflächen, Mist sowie Außenluft) ergab sich eine eher geringe Kontamination. ESBL/AmpC-*E. coli* konnten vereinzelt im gelagerten Mist sowie auf Bodenoberflächen nachgewiesen werden, allerdings bei letzteren nur sehr geringe Erregerkonzentrationen. Weiterführende molekularbiologische Untersuchungen zeigten einen potenziellen epidemiologischen Zusammenhang von Isolaten aus Tieren, der Tierumgebung sowie der Stallumgebung. Dies zeigt, dass neben einem Austrag über Mist oder Staub auch ein Eintrag in den Tierstall über die Zeit aus einer gering kontaminierten Umgebung stattfinden könnte.

## 5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Im Rahmen des Projektantrages gab es verschiedene Ziele:

- Erhebung des Vorkommens von ESBL-bildenden *E. coli* in Putenbeständen in Deutschland einschließlich des Vergleichs zur Situation beim Masthähnchen

Dieses Ziel wurde im Projekt vollumfänglich erreicht. Es wurden insgesamt 48 konventionelle Putenmastbetriebe auf das Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* untersucht. Geplant waren ursprünglich 40, nach Anpassung der Betriebsauswahl für die Querschnittstudie 46 Betriebe, definiert verteilt auf die putenhaltenden Bundesländer. Die Gesamtzahl der Betriebe wurde somit erreicht. Die Verteilung der untersuchten Betriebe wurde bis auf eine Ausnahme auch so wie vorher epidemiologisch-statistisch definiert umgesetzt. Lediglich in Niedersachsen konnten nur 17 von 18 Betrieben gescreent werden, da ein Betrieb zum Ende des Projektes kurzfristig seine Teilnahme absagte und es leider nicht mehr möglich war, kurzfristig einen neuen Betrieb zu gewinnen.

- Beschreibung von Ausbreitungswegen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in Putenmastbeständen einschließlich des Vergleichs zur Situation beim Masthähnchen

Auch dieses Ziel konnte vollumfänglich erreicht werden. Die dafür vorgesehenen sieben Putenmastbetriebe wurden dreimal innerhalb einer Mastperiode intensiv untersucht. Die Ergebnisse wurden im Bericht mit denen beim Masthähnchen sowie beim Mastschwein verglichen.

- Übersicht über die Enzymtypen bei den isolierten ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* einschließlich des Vergleichs zur Situation beim Masthähnchen

Im Projekt wurde eine umfangreiche Untersuchung der gewonnenen ESBL/AmpC-Isolate vorgenommen. Dies war insgesamt sehr aufwendig, da häufig verschiedenste Gen-Kombinationen auftauchten, was die Anzahl der notwendigen molekularbiologischen Untersuchungen (PCR-Reaktionen, Sequenzierungen) erhöhte. Letztlich wurde von jeder Probe ein Isolat weiterführend untersucht, bei negativen Ergebnis wurden zwei weitere Isolate derselben Probe dahingehen



analysiert. Parallel dazu wurde auch stets die phänotypische Resistenz ermittelt. Beide Ergebnisse in Kombination definieren nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft den ESBL/AmpC-Status.

- Bereitstellung der Daten für vergleichende epidemiologische Untersuchungen mit schon vorhandenen Daten aus dem RESET-I-Forschungsverbundes

Dafür wurden alle Daten so aufgearbeitet, dass sie in die Datenbank des Forschungsverbundes eingepflegt werden konnten. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit der Universität Leipzig, welche dafür einen Unterauftrag erhielt. Somit können die Daten aus diesem Projekt optimal genutzt und hinsichtlich verschiedenster Fragestellungen ausgewertet werden.

- Erfassung umfangreicher Daten für eine spätere Bestimmung von potentielle Risikofaktoren für das Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenen *E. coli* in Putenmastbeständen

Mit Hilfe eines ausführlichen Fragebogen wurden verschiedenste potenziell relevante Faktoren zum allgemeinen Betriebsmanagement, Hygienemanagement, Medikamentengabe, Biosicherheitsmaßnahmen, Herkunft der Tiere, Lage des Betriebes, ect. erfasst. Die Daten wurden mit den mikrobiologischen Ergebnissen systematisch in eine Datenbank aufgenommen. Eine Auswertung zur Identifizierung von Risikofaktoren erfolgt derzeit.

## 6. Literaturverzeichnis

- Batchelor, M., Hopkins, K., Threlfall, E.J., Clifton-Hadley, F.A., Stallwood, A.D., Davies, R.H., Liebana, E., 2005. bla(CTX-M) genes in clinical Salmonella isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 1319-1322.
- Carattoli, A., Garcia-Fernandez, A., Varesi, P., Fortini, D., Gerardi, S., Penni, A., Mancini, C., Giordano, A., 2008. Molecular epidemiology of Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. *Journal of clinical microbiology* 46, 103-108.
- Chmelnitsky, I., Carmeli, Y., Leavitt, A., Schwaber, M.J., Navon-Venezia, S., 2005. CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the major extended-spectrum beta-lactamases in multiple Escherichia coli clones isolated in Tel Aviv, Israel. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 4745-4750.
- Costa, D., Vinue, L., Poeta, P., Coelho, A.C., Matos, M., Saenz, Y., Somalo, S., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C., 2009. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary microbiology* 138, 339-344.
- Dierikx, C., van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Mevius, D., 2013. Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing Escherichia coli in Dutch broilers and broiler farmers. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68, 60-67.
- EFSA, 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.
- Egea, P., Lopez-Cerero, L., Torres, E., Gomez-Sanchez Mdel, C., Serrano, L., Navarro Sanchez-Ortiz, M.D., Rodriguez-Bano, J., Pascual, A., 2012. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in the south of Spain. *International journal of food microbiology* 159, 69-73.
- Friese, A., Schulz, J., Laube, H., von Salviati, C., Hartung, J., Roesler, U., 2013. Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (laMRSA) and ESbl/AmpC-producing E. coli from animal farms in Germany. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift* 126, 175-180.
- Geser, N., Stephan, R., Hachler, H., 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC veterinary research* 8, 21.
- Hansen, K.H., Damborg, P., Andreasen, M., Nielsen, S.S., Guardabassi, L., 2013. Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing Escherichia coli in pigs: a longitudinal study. *Applied and environmental microbiology* 79, 794-798.
- Hering, J., Fromke, C., von Munchhausen, C., Hartmann, M., Schneider, B., Friese, A., Rosler, U., Kreienbrock, L., Hille, K., 2016. Cefotaxime-resistant Escherichia coli in broiler farms-A cross-sectional investigation in Germany. *Preventive veterinary medicine* 125, 154-157.
- Hering, J., Hille, K., Fromke, C., von Munchhausen, C., Hartmann, M., Schneider, B., Friese, A., Roesler, U., Merle, R., Kreienbrock, L., 2014. Prevalence and potential risk factors for the occurrence of cefotaxime resistant Escherichia coli in German fattening pig farms--a cross-sectional study. *Preventive veterinary medicine* 116, 129-137.
- Hopkins, K.L., Deheer-Graham, A., Threlfall, E.J., Batchelor, M.J., Liebana, E., 2006. Novel plasmid-mediated CTX-M-8 subgroup extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-40) isolated in the UK. *International journal of antimicrobial agents* 27, 572-575.
- Jiang, H.X., Tang, D., Liu, Y.H., Zhang, X.H., Zeng, Z.L., Xu, L., Hawkey, P.M., 2012. Prevalence and characteristics of beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone

- resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67, 2350-2353.
- Johns, I., Verheyen, K., Good, L., Rycroft, A., 2012. Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from horses treated with antimicrobials: a longitudinal study in hospitalised and non-hospitalised horses. *Veterinary microbiology* 159, 381-389.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Kasbohrer, A., Kreienbrock, L., Roesler, U., 2013. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Applied and environmental microbiology* 79, 4815-4820.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Rosler, U., 2014. Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Veterinary microbiology* 172, 519-527.
- Machado, E., Coque, T.M., Canton, R., Sousa, J.C., Peixe, L., 2008. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum {beta}-lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 62, 296-302.
- Merle, R., Busse, M., Rechter, G., Meer, U., 2012. [Regionalisation of Germany by data of agricultural structures]. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 125, 52-59.
- Olesen, I., Hasman, H., Aarestrup, F.M., 2004. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb Drug Resist* 10, 334-340.
- Projahn et al., 2016. in preparation.
- Randall, L.P., Clouting, C., Horton, R.A., Coldham, N.G., Wu, G., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., Teale, C.J., 2011. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66, 86-95.
- 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.
- Ruiz del Castillo, B., Vinué, L., Román, E.J., Guerra, B., Carattoli, A., Torres, C., Martínez-Martínez, L., 2013. Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *BMC microbiology* 13, 1-12.
- Schmid, A., Hormansdorfer, S., Messelhauser, U., Kasbohrer, A., Sauter-Louis, C., Mansfeld, R., 2013. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Applied and environmental microbiology* 79, 3027-3032.
- Von Salviati, C., Friese, A., Roschanski, N., Laube, H., Guerra, B., Kasbohrer, A., Kreienbrock, L., Roesler, U., 2014. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in German fattening pig farms: a longitudinal study. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 127, 412-419.
- Wasyl, D., Hasman, H., Cavaco, L.M., Aarestrup, F.M., 2012. Prevalence and characterization of cephalosporin resistance in nonpathogenic *Escherichia coli* from food-producing animals slaughtered in Poland. *Microb Drug Resist* 18, 79-82.
- Weill, F.X., Demartin, M., Tande, D., Espie, E., Rakotoarivony, I., Grimont, P.A., 2004. SHV-12-like extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *Journal of clinical microbiology* 42, 2432-2437.

Datum: Berlin, 27. April 2016

Unterschriften:

Dr. Anika Friese

Prof. Dr. Uwe Rösler