

Resistenzen bei Bakterienisolaten aus der Nase von Aufzuchtälbern in Milchviehbetrieben

F. Pipoz¹, V. Perreten², M. Meylan¹

¹Wiederkäuferklinik und ²Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse Fakultät, Universität Bern

Zusammenfassung

In 52 Milchviehbetrieben wurden 157 Nasentupfer von Aufzuchtälbern entnommen, aus denen 56 *Escherichia coli*, 37 *Pasteurella multocida* und 8 *Mannheimia haemolytica* isoliert wurden. Die Resistenzprofile dieser Keime wurden mittels Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentrationen ermittelt. Bei *E. coli* zeigten 55.3% der isolierten Stämme Resistenz gegen Tetrazykline, 55.3% gegen Sulfonamide, 39.3% gegen Beta-Laktame, 30.3% gegen Aminoglykoside, 8.9% gegen Fluorochinolone und 3.5% gegen Cephalosporine der 3. Generation. Die 3. Generation Cephalosporin-resistenten Isolate wiesen ein Extended-Spectrum-Beta-Laktamase Gen *bla*_{CTX-M-14} auf und stammten aus 2 Betrieben, in welchen die Milch von Kühen unter antibiotischer Behandlung an die Älber verfüttert wurde und Cefquinom als Mittel erster Wahl bei Mastitisbehandlungen verwendet wurde. Bei *P. multocida* waren 48.6% der Stämme resistent gegen Tetrazykline, 16.2% gegen Beta-Laktame, und je 5.4% gegen Makrolide, Aminoglykoside und Sulfonamide. Die 8 *M. haemolytica* Isolate waren sensitiv gegen alle getesteten Antibiotika.

Schlüsselwörter: Antibiotika, Resistenzen, *E. coli*, Pasteurellaceae, Schweiz

Bacterial resistance in bacteria isolated from the nasal cavity of Swiss dairy calves

Fifty-six *E. coli*, 37 *P. multocida* und 8 *M. haemolytica* were isolated from 157 nasal swabs taken from calves in 52 dairy herds. The antibiotic susceptibility of the organisms was determined by measurement of the minimal inhibitory concentrations. Of the 56 *E. coli* isolates, 55.3% exhibited resistance to tetracyclines, 55.3% to sulfonamides, 39.3% to beta-lactams, 30.3% to aminoglycosides, 8.9% to fluorochinolones and 3.5% to 3rd generation cephalosporins. The 3rd generation cephalosporin-resistant isolates contained the extended spectrum-beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M-14} and came from 2 farms where the milk of cows under antimicrobial treatment was fed to the calves and mastitis was treated with cefquinome as first line therapy. Of the 37 *P. multocida* isolates, 48.6% exhibited resistance to tetracyclines, 16.2% to beta-lactams, and 5.4% each to macrolides, aminoglycosides and sulfonamides. The 8 *M. haemolytica* isolates showed no resistances against the tested antibiotics.

Keywords: antibiotics, resistance, *E. coli*, Pasteurellaceae, Switzerland

DOI 10.17236/sat00065

Eingereicht: 08.04.2016
Angenommen: 06.05.2016

Einleitung

Bakterielle Resistenzen gegen Antibiotika stellen bei Mensch und Tier eine der wichtigsten „public health“ sowie veterinär- und humanmedizinischen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts dar (Nedbalcova et al., 2014; WHO 2012; StAR, 2015). Im Vordergrund steht die Problematik der Übertragung von resistenten Bakterien und von Resistenzfaktoren von Tier zu Mensch und umgekehrt (WHO, 1997; Seiffert et al., 2013; StAR, 2015). Der unsachgemässe Einsatz von Antibiotika, wie Unterdosierung oder die Wahl des falschen Antibiotikums, kann zur Selektion und Entwicklung bakterieller

Resistenzen führen (Schwarz et al., 2001). Indirekt spielen auch die Verabreichung von Milch mit Rückständen antibiotikahaltiger Medikamente an Älber oder Schweine (Langford et al., 2003) und der Transfer von Resistenzen zwischen Bakterien selbst (Thomas et al., 2005) eine Rolle bei deren Verbreitung. In der Schweiz liegen aktuelle Informationen zum Antibiotikaverbrauch bei Mastälbern vor (Luginbühl et al., 2012; Beer et al., 2015; Lava et al., 2016a; Lava et al., 2016b), jedoch sind keine Aufzeichnungen über den Antibiotikaeinsatz und die bakteriellen Resistenzen bei Aufzuchtälbern verfügbar. Das Ziel der vorliegenden Studie war, die Resistenzlage von Bakterien, die aus der Nase von Auf-

Resistenzen bei Bakterienisolationen aus der Nase von Aufzuchtältern in Milchviehbetrieben

F. Pipoz et al.

zuchtältern in Milchviehbetrieben isoliert wurden, zu beschreiben, wobei die Behandlungsstrategien der Betriebe und allfällige antibiotische Vorbehandlungen der einzelnen Kälber bekannt waren.

Tiere, Material und Methoden

In 52 an anderer Stelle (Pipoz und Meylan, 2016) genau beschriebenen Milchviehbetrieben wurden von je 3 Kälbern Nasentupfer (Transwab® Amies MW170, Medical Wire & Equipment, Corsham, Wiltshire, England) entnommen (Aebi et al., 2015). Nach Möglichkeit wurden Kälber beprobt, die zuvor mit Antibiotika behandelt worden waren.

Die Proben wurden innerhalb von maximal 24 Stunden ins Institut für Veterinär bakteriologie der Universität Bern gebracht. Die Nasentupfer wurden auf Trypticase-Soy-Agar mit 5% Schafblut (TSA-S, Becton & Dickinson AG, Allschwil), MacConkey-Agar und Pasteurella Selektiv-Agar (Oxoid AG, Pratteln) ausgestrichen. Die Agar-Platten wurden 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Verdächtige Kolonien wurden auf TSA-S umgezüchtet, 24 Stunden bei 37°C inkubiert, und auf Katalase, Oxidase und Indol Reaktionen getestet, um *Escherichia coli* (Oxidase-negativ, Indol-positiv) und Pasteurellen (Katalase-positiv, Oxidase-spät positiv) zu identifizieren. Die Stämme wurden mittels Maldi-ToF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry; Microflex MS, Bruker AG, Bremen, Deutschland) und dem Direct Transfer Protocol auf Speziesebene identifiziert. Pasteurellen und *E. coli* Stämme wurden in 30% Glycerol-Gefriermedium bei -80°C kryokonserviert. Die minimalen Hemmstoffkonzentrationen (MHK)

wurden anhand einer kation-adjustierten Müller-Hinton Bouillon auf Sensititre Mikrotiterplatte NLV39 für Pasteurellaceen (*Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica*) und EUMVS2 für *Escherichia coli* (*E. coli*) (Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, West Sussex, England) bestimmt und gemäss EUCAST und CLSI Richtlinien interpretiert (CLSI, 2015; EUCAST, 2016). Die MHK₅₀ und MHK₉₀ wurden nach Schwarz et al. (2010) etabliert. Die Anwesenheit einer Extended-Spectrum-Beta-Laktamase (ESBL) wurde anhand der CLSI Richtlinien (Breakpoint für Cefotaxim und Ceftazidim: ≥1 mg/L) vermutet (CLSI, 2015). Die Anwesenheit des ESBL Gens wurde mittels PCR untersucht (Vogt et al. 2014).

Die Resultate der Empfindlichkeitsüberprüfung der Isolate wurden mittels einer deskriptiven Analyse mit den Vorbehandlungen der einzelnen Kälber verglichen.

Ergebnisse

In den 52 teilnehmenden Betrieben wurden insgesamt 157 Nasentupfer entnommen, aus welchen 56 *E. coli*, 37 *P. multocida* und 8 *M. haemolytica* isoliert wurden. Insgesamt waren 56 Kälber in 36 Betrieben mit *E. coli* kolonisiert, 37 in 22 Betrieben mit *P. multocida*, und 8 in 7 Betrieben mit *M. haemolytica*. Von den Nasentupfern aus 6 Betrieben wurden weder *E. coli* noch Pasteurellaceae isoliert. Bei den 18 in diesen Betrieben beprobten Kälbern waren 3 in den vorhergehenden Tagen mit Antibiotika behandelt worden. Tabelle 1 zeigt die Resistenzraten von *E. coli*, *P. multocida* und *M. haemolytica*, sowie den Anteil jener Bakterien, bei welchen das Kalb

Tabelle 1: Resistenzlage bei aus Nasentupfern isolierten *E. coli*, *P. multocida* und *M. haemolytica* Stämmen.

	<i>Escherichia coli</i> n = 56				<i>Pasteurella multocida</i> n = 37				<i>Mannheimia haemolytica</i> n = 8			
	Anzahl resistenter Stämme	Resistente Stämme in %	Anzahl resistente Stämme nach Antibiose ^a	Resistente Stämme nach Antibiose in % ^a	Anzahl resistenter Stämme	Resistente Stämme in %	Anzahl resistente Stämme nach Antibiose ^a	Resistente Stämme nach Antibiose in % ^a	Anzahl resistenter Stämme	Resistente Stämme in %	Anzahl resistente Stämme nach Antibiose ^a	Resistente Stämme nach Antibiose in % ^a
Tetrazykline	31	55.3	9	29.0	18	48.6	5	27.7	0	0	0	0
Beta-Laktame	22	39.3	2	9.0	6	16.2	1	16.7	0	0	0	0
Cephalosporine 3. Generation	2	3.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulfonamide und potenzierte Sulfonamide	31	55.3	0	0	2	5.4	0	0	0	0	0	0
Fluorochinolone	5	8.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Makrolide	N/A ^b	N/A ^b	N/A ^b	N/A ^b	2	5.4	2	100	0	0	0	0
Aminoglykoside	17	30.3	1	5.8	2	5.4	0	0	0	0	0	0

N/A = not applicable

^a Von Kälbern, welche mit einem Antibiotikum der entsprechenden Gruppe vorbehandelt wurden, isolierte Stämme.

^b Für *E. coli* wurden keine minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) für Makrolide bestimmt.

vor der Beprobung mit einem Antibiotikum der entsprechenden Klasse behandelt worden war.

Von den 56 *E. coli* Isolaten waren 32 (57.1%) gegen 2 oder mehr Antibiotika resistent, 6 (10.7%) gegen ein Antibiotikum und 18 Stämme (32.2%) zeigten keine Resistenzen. Bei den multiresistenten Stämmen waren die Tetrazyklin-, Ampicillin-, und Sulfonamid-Resistenzen die am häufigsten vorkommenden Ko-Resistenzen. Aus den 22 Ampicillin-resistenten *E. coli* waren 21 (95.4%) auch resistent gegen Sulfonamide (oder Sulfonamide-Trimethoprim) und Tetrazykline. Von den 31 gegen Sulfonamide (allein oder mit Trimethoprim kombiniert) resistenten *E. coli* Stämmen waren 20 (64.5%) auch gegen Ampicillin und 28 (90.3%) ebenfalls gegen Tetrazykline unempfindlich. Weiter waren 20 der 31 Tetrazyklin-resistenten *E. coli* (64.5%) zugleich auch gegen Ampicillin resistent, 28 darunter (90.3%) ebenfalls gegen Sulfonamide oder die Kombination aus Sulfonamiden und Trimethoprim. Drei *E. coli* Stämme aus 2 Betrieben zeigten verminderte Sensitivität gegenüber beiden untersuchten Cephalosporinen dritter Generation, Cefotaxim und Ceftazidim, was auf ein erworbenes ESBL Gen *bla_{CTX-M-14}* zurückzuführen war.

Zehn der 37 isolierten *P. multocida* (27.0%) waren gegen 2 oder mehr Antibiotika resistent, 16 Stämme (43.2%) gegen ein Antibiotikum, während 11 Stämme (29.7%) keine Resistenzen zeigten. Resistenzen gegen Tilmicosin, Tetrazykline, Ampicillin, Aminoglykoside und Sulfonamide wurden nachgewiesen. Bei den 8 *M. haemolytica* Isolaten wurden keine Resistenzen festgestellt. Die

Verteilung der MHK der isolierten *E. coli*, *P. multocida* und *M. haemolytica* Stämme ist in den Tabellen 2, 3 und 4 dargestellt.

Resistenzen bei Bakterienisolationen aus der Nase von Aufzuchtältern in Milchviehbetrieben

F. Pipoz et al.

Diskussion

Die Entnahme von Nasentupfern bei 3 Kälbern pro Betrieb in der vorliegenden Studie hatte nicht zum Ziel, die Verteilung oder Bedeutung der an Kälberpneumonie beteiligten Erreger zu erfassen. Die Proben wurden bei einem einmaligen Besuch in jedem Bestand (Pipoz und Meylan, 2016) entnommen, wobei die Besuche nicht nach Anwesenheit von an Pneumonie erkrankten Kälbern geplant wurden. Das Ziel der Entnahme von Nasentupfern war, die Resistenzen der in den oberen Atemwegen von Aufzuchtältern vorhandenen Bakterien zu bestimmen. Pasteurellaceae gehören neben ihrer Rolle in der Entstehung von Lungenentzündungen auch zur normalen Flora der oberen Atemwege und können sich bei günstigen Verhältnissen vermehren, in die Lunge aspiriert werden und dort eine Pneumonie hervorrufen (Mosier, 1997). *E. coli* wurden als Indikatorkeime mituntersucht, da sie bei 35.6% der Kälber aus den Nasenhöhlen isoliert werden konnten (transitäre Keime). Die Resistenzlage sowohl bei Pasteurellen als auch bei *E. coli* wurde bereits von anderen Autoren untersucht, um den Effekt antibiotischer Behandlungen auf bakterielle Resistenzen zu dokumentieren (Catry et al., 2016). Aus diesem Grund wurden vorzugsweise Kälber beprobt, die kurz vorher oder während des Bestandesbesuchs unter antibiotischer Behandlung gestanden hatten.

Tabelle 2: Verteilung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der aus Nasentupfern von Aufzuchtältern isolierten *E. coli* Stämme für verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe.

		MHK (mg/L) für <i>E. coli</i> (n=56)																							
Antimikrobielle Wirkstoffe	Break-point ^a	Quelle	< 0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	> 1024	MHK 50	MHK 90	
Sulfamethoxazol	≥ 512	CLSI M100-S24										4			15	6	1				1	29	> 1024	> 1024	
Gentamicin	> 4	EUCAST						1	13	34	1				3	2	2							1	16
Ciprofloxacin	> 1	EUCAST	6	39	5		1							3	2									0.015	0.12
Ampicillin	> 8	EUCAST									6	27	1				22							4	> 32
Cefotaxim ^b	> 2	EUCAST			45		8				1			2										< 0.06	0.12
Ceftazidim ^b	> 4	EUCAST					53				2		1											< 0.25	< 0.25
Tetrazyklin	≥ 16	CLSI M100-S24										18	7		1	1	5	24						64	> 64
Streptomycin	N/A											3	21		2	8	4				18			64	> 512
Trimethoprim	≥ 16	CLSI M100-S24						41		7	2						6							< 0.5	> 32
Colistin	> 2	EUCAST									56													< 2	< 2
Florfenicol	N/A										3		16	34	1			2						8	8
Kanamycin	≥ 64	CLSI M100-S24										39			1			1	15					< 4	> 128
Nalidixic Säure	≥ 32	CLSI M100-S24										49		1			1	5						< 4	64

In der Tabelle wird jeweils die Anzahl Stämme aus den 56 *E. coli* Isolaten pro MHK-Kategorie angegeben.

^a Breakpoint = MHK-Grenzwert, über welchen ein Bakterienstamm nach Eucast oder CLSI Richtlinien als resistent gilt; die Breakpoints sind jeweils in der Tabelle mit einer vertikalen Linie angegeben.

^b Stämme mit MHK ≥ 1mg/L für diese Antibiotika hatten ein Extended-Spectrum-Beta-Laktamase Gen *bla_{CTX-M-14}*.

Die weissen Bereiche zeigen den Testbereich für jedes Antibiotikum an. Zahlen im grauen Bereich oberhalb des Testbereichs beziehen sich auf die Zahl der Isolate, deren MHK-Werte oberhalb der maximalen untersuchten Konzentration lagen. Isolate, deren MHK-Werte kleiner oder gleich der kleinsten getesteten Konzentration waren, werden in der niedrigsten Konzentration angegeben.

Tabelle 3: Verteilung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der aus Nasentupfern von Aufzuchtkälbern isolierten *P. multocida* Stämme für verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe.

MHK (mg/L) für <i>P. multocida</i> (n=37)																					
Antimikrobielle Wirkstoffe	Breakpoint ^a	Sensibel	Intermediär	Resistent	Quelle	< 0.06	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	> 128	MHK 50	MHK 90
Tiamulin	N/A											15		4	13	5				8	32
Cefquinom	N/A								37											≤1	≤1
Tetrazyklin	≥ 8	≤ 2	4	≥ 8	CLSI VET01S				23		6		1	1	16					≤1	>16
Enrofloxacin	≥ 2	≤ 0.25	0.5 - 1	≥ 2	CLSI VET01S	36	1													<0.06	<0.06
Penicillin	≥ 1	≤ 0.25	0.5	≥ 1	CLSI VET01S	13	4	12	2		1	4			1					0.25	4
Amoxicillin/Clavulansäure	> 1	≤ 1	-	> 1	EUCAST					37										<2	<2
Colistin	N/A							20		14	1	1	1							<0.5	1
Ceftiofur	≥ 8	≤ 2	4	≥ 8	CLSI VET01S				36		1									<1	<1
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	> 0.25	≤ 0.25	-	> 0.25	EUCAST		35		1					1						<0.25	<0.25
Spectinomycin	≥ 128	≤ 32	64	≥ 128	CLSI VET01S										23	12			2	16	32
Cephalotin	N/A										36				1					<4	<4
Tilmicosin ^b	≥ 32	≤ 8	16	≥ 32	CLSI VET01S						18		8	9	2					8	16
Florfenicol	≥ 8	≤ 2	4	≥ 8	CLSI VET01S				36			1								<1	<1
Neomycin	N/A											31			5		1			<8	16
Gentamicin	N/A										24		12			1				<2	4

In der Tabelle wird jeweils die Anzahl Stämme aus den 37 *P. multocida* Isolaten pro MHK-Kategorie angegeben.

^a Breakpoint = MHK-Grenzwert, über welchen ein Bakterienstamm nach Eucast oder CLSI Richtlinien als resistent gilt; die Breakpoints sind jeweils in der Tabelle mit einer vertikalen Linie angezeigt.

^b Tilmicosin = basiert auf Breakpoints für Erreger von Schweinekrankheiten.

Die weissen Bereiche zeigen den Testbereich für jedes Antibiotikum an. Zahlen im grauen Bereich oberhalb des Testbereichs beziehen sich auf die Zahl der Isolate, deren MHK-Werte oberhalb der maximalen untersuchten Konzentration lagen. Isolate, deren MHK-Werte kleiner oder gleich der kleinsten getesteten Konzentration waren, werden in der niedrigsten Konzentration angegeben.

Bei *E. coli* Stämmen wurden die höchsten Resistenzraten gegen Tetrazykline und Sulfonamide (je 55.3%) beobachtet. Hohe Resistenzraten bei *E. coli* von Mastkälbern gegenüber Ampicillin, Sulfamethoxazol, Streptomycin und Tetrazyklin wurden auch bei den im Rahmen des Antibiotikaresistenzmonitorings bei Nutztieren in der Schweiz isolierten Stämmen festgestellt (Büttner et al., 2014). Tetrazykline gehörten zu den bei Aufzuchtkälbern im Studienggebiet am meisten eingesetzten Antibiotika (Pipoz und Meylan, 2016). Aufgrund der von den Landwirten ausgefüllten Behandlungstabellen konnte festgestellt werden, dass die Dosierung sowie die Dauer der Therapie häufig zu tief bzw. zu kurz waren. Dies bestätigt, dass eine falsche Anwendung von Antibiotika zur Resistenzbildung infolge eines erhöhten Selektionsdruckes führen kann (Khachatourians, 1998). Die Tatsache, dass 29% der tetrazyklinresistenten *E. coli* von mit Tetrazyklinen vorbehandelten Kälbern stammten, verdeutlicht den ungewünschten Effekt eines verstärkten Selektionsdruckes nach Behandlung mit Antibiotika. Die Resistenzrate von *E. coli*-Stämmen gegen Sulfonamide (oder potenzierte Sulfonamide) und Tetrazykline erwies sich als gleich hoch (55.3%). Im Studienggebiet wurden sulfonamidhaltige Präparate meistens peroral appliziert (Pipoz und Meylan, 2016). Dabei gaben die Landwirte an, dass sie die zur Behandlung erforderliche Menge Pulver geschätzt, jedoch nie genau gemessen hatten. Somit kann auch für diese Gruppe antimikrobieller Wirkstoffe häufig eine Unterdosierung vorgelegen haben. Die meisten Multiresistenzen bestanden gegen die am häufigsten verwen-

deten Antibiotika (Tetrazykline, Beta-Laktame und Sulfonamide). Im hiesigen Studienggebiet wurden Aminoglykoside bei Kälberkrankheiten fast nie eingesetzt (Pipoz und Meylan, 2016), jedoch zeigten 30.3% der isolierten *E. coli* Resistenzen gegen diese Antibiotika-Klasse. Weiter ist die beobachtete Resistenzrate von 8.9% der isolierten *E. coli* Stämme gegen Fluorochinolone bedenklich, da es sich dabei um „critically important antimicrobials of highest priority“ handelt (WHO, 2012). Dies lässt vermuten, dass Fluorochinolone auch bei Aufzuchtkälbern nicht nur als Reserveantibiotika eingesetzt werden. Dies wurde kürzlich in mehreren Studien über Behandlungen bei Mastkälbern in der Schweiz auch beobachtet (Beer et al., 2015; Lava et al., 2016b). Alle 3 *E. coli* Stämme, die eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber den Cephalosporinen dritter Generation Cefotaxim und Ceftazidim zeigten, enthielten ein ESBL Gen *bla*_{CTX-M-14}. Sie hatten sich in 2 Betrieben etabliert, in denen die Kälber mit der Milch von behandelten Kühen während der Antibiose und danach (bis zum Ablauf der Absetzfristen) getränkt wurden (Pipoz und Meylan, 2016). Die nachträgliche Befragung beider Betriebsleiter zu deren Vorgehensweise bei Mastitisbehandlungen ergab, dass alle Mastitiden ihrer Tiere mit Cefquinom als erste Wahl behandelt wurden. Es ist daher plausibel, dass die Verabreichung antibiotikahaltiger Milch in diesen Betrieben zur Verbreitung bakterieller Resistenzen bei Kälbern beigetragen hat. Dieser Zusammenhang ist an anderer Stelle schon mehrfach nachgewiesen worden (Langford et al., 2003; Duse et al., 2015). Es ist ausserdem anzumerken,

Tabelle 4: Verteilung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der aus Nasentupfern von Aufzuchtälbern isolierten *M. haemolytica* Stämme für verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe.

MHK (mg/L) für <i>M. haemolytica</i> (n=8)																					
Antimikrobielle Wirkstoffe	Breakpoint ^a	Sensibel	Intermediär	Resistent	Quelle	< 0.06	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	> 128	MHK 50	MHK 90
Tiamulin	N/A													2	5	1				16	32
Cefquinom	N/A																			<1	<1
Tetrazyklin	≥ 8	≤ 2	4	≥ 8	CLSI VET01S				8											<1	<1
Enrofloxacin	≥ 2	≤ 0.25	0.5 - 1	≥ 2	CLSI VET01S	6		1	1											<0.06	0.5
Penicillin	≥ 1	≤ 0.25	0.5	≥ 1	CLSI VET01S	5			1	2										<0.06	0.5
Amoxicillin/Clavulansäure	N/A										8									<2	<2
Colistin	N/A								7		1									<0.5	1
Ceftiofur	≥ 8	≤ 2	4	≥ 8	CLSI VET01S				8											<1	<1
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	N/A						8													<0.25	<0.25
Spectinomycin	≥ 128	≤ 32	64	≥ 128	CLSI VET01S								1		5	2				16	32
Cephalotin	N/A											8								<4	<4
Tilmicosin	≥ 32	≤ 8	16	≥ 32	CLSI VET01S							3		4	1					8	16
Florfenicol	≥ 8	≤ 2	4	≥ 8	CLSI VET01S				8											<1	<1
Neomycin	N/A												8							<8	<8
Gentamicin	N/A										7		1							<2	4

In der Tabelle wird jeweils die Anzahl Stämme aus den 8 *M. haemolytica* Isolaten pro MHK-Kategorie angegeben.

^a Breakpoint = MHK-Grenzwert, über welchen ein Bakterienstamm nach Eucast oder CLSI Richtlinien als resistent gilt; die Breakpoints sind jeweils in der Tabelle mit einer vertikalen Linie angezeigt.

Die weissen Bereiche zeigen den Testbereich für jedes Antibiotikum an. Zahlen im grauen Bereich oberhalb des Testbereichs beziehen sich auf die Zahl der Isolate, deren MHK-Werte oberhalb der maximalen untersuchten Konzentration lagen. Isolate, deren MHK-Werte kleiner oder gleich der kleinsten getesteten Konzentration waren, werden in der niedrigsten Konzentration angegeben.

dass die routinemässige Behandlung aller Euterentzündungen, d. h. auch von Bagatellfällen, mit einem Cephalosporin 4. Generation weder den Prinzipien von „prudent use of antimicrobials“ (WHO, 2012) noch der Schweizerischen Gesetzgebung entspricht. Auch der hohe Anteil (57.1%) an *E. coli* Stämmen mit 2 oder mehr Resistenzen ist wegen des Risikos von Behandlungsversagen und des Potenzials, dass multiresistente Keime auf den Menschen übertragen werden, alarmierend.

Die Resistenzlage der untersuchten Pasteurellen gegen Tetrazykline war vergleichbar mit derjenigen von *E. coli*. Erneut besteht der Verdacht, dass der häufige Einsatz von Tetrazyklinen und eine möglicherweise falsche Anwendung zur hohen Resistenzrate beigetragen haben. In der Schweiz war vor ca. 15 Jahren für *P. multocida* eine vergleichsweise tiefe Resistenzrate von 15% gegen Tetrazykline beobachtet worden (Vogel et al. 2001), und Rérat et al. (2012) stellten noch tiefere Resistenzraten gegen Tetrazykline (6% gegen Chlortetrazyklin und 11% gegen Oxytetrazyklin) in einer kleinen Gruppe von Mastkälbern fest. In der vorliegenden Studie wurden die Nasentupfer gezielt von vorbehandelten Kälbern entnommen, was möglicherweise mindestens zum Teil die hohe Resistenzrate erklären kann. Die Landwirte berichteten nicht von ausbleibenden Behandlungserfolgen bei der Therapie von Kälberpneumonien mit Tetrazyklinen, die klinische Wirksamkeit der eingesetzten Behandlungen wurde in der Regel als gut betrachtet. Bei den

M. haemolytica Isolaten betrug die Resistenzrate gegen Tetrazykline und Sulfonamide 0%, jedoch sind diese Resultate aufgrund der kleinen Anzahl von Isolaten (8) mit Vorsicht zu interpretieren.

Die Resistenzlage gegen Makrolide, die zu den „critically important antimicrobials of highest priority“ gehören (WHO, 2012), lag bei 5.4% bei *P. multocida* und 0% bei *M. haemolytica*. Makrolidhaltige Präparate wurden im Studiengebiet relativ selten (in 12.5% aller Behandlungen) eingesetzt (Pipoz und Meylan, 2016). Die tiefen beobachteten Resistenzraten von Pasteurellaceae gegen Makrolide könnten mindestens zum Teil durch einen relativ tiefen Selektionsdruck zu erklären sein. Es ist jedoch bemerkenswert, dass beide Kälber, bei denen resistente *P. multocida* isoliert wurden, mit makrolidhaltigen Antibiotika vorbehandelt waren. Sehr hohe Resistenzraten gegen Makrolide (56–88%) wurden von Rérat et al. (2012) bei Mastkälbern beschrieben, die alle metaphylaktisch mit Makroliden vorbehandelt worden waren. Dies ist insbesondere besorgniserregend, weil gemäss Lava et al. (2016b) makrolidhaltige Präparate für 91.9% der parenteralen Gruppenbehandlungen und für 55.3% der oralen Gruppenbehandlungen von Mastkälbern eingesetzt wurden.

Hingegen zeigen die vorliegenden Resultate, dass Beta-Laktame aktuell noch gut gegen Pasteurellen wirksam sind. Die festgestellten Resistenzraten (16.2% bei

Resistenzen bei Bakterienisolationen aus der Nase von Aufzuchtälbern in Milchviehbetrieben

F. Pipoz et al.

P. multocida, 0% bei den 8 isolierten *M. haemolytica* Stämmen) bestätigen die Beobachtungen von Catry et al. (2005) und Nedbalcova et al. (2014), dass diese Antibiotika-Klasse bei durch Pasteurellen verursachten Infektionen aufgrund ihrer guten Wirksamkeit immer noch zu empfehlen ist.

Dass keine Resistenzen gegen Fluorochinolone bei den isolierten Pasteurellaceae beobachtet wurden, muss aufgrund der beschränkten Anzahl Isolate, insbesondere bei *M. haemolytica*, mit Vorsicht interpretiert werden. Auf jeden Fall sollte durch eine strikte Anwendung dieser Antibiotikaklasse als Reserve-Antibiotika und gemäss der Prinzipien von „prudent use of antibiotics“ dafür gesorgt werden, dass tiefe Resistenzraten und somit eine hohe Wirksamkeit dieser Wirkstoffe noch lange erhalten bleiben.

Schlussfolgerung

Die vorliegenden Resultate deuten auf Lücken im optimalen Einsatz von Antibiotika bei Aufzuchtälbern

hin, insbesondere wenn auf Vorrat abgegebene Medikamente von den Landwirten selber appliziert werden. Dies spiegelte sich in relativ hohen bakteriellen Resistenzraten wider. Die festgestellten Defizite im sachgemässen Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen müssen durch eine strengere Einhaltung der Prinzipien von „prudent use of antimicrobials“ durch die Tierärzte und durch eine bessere Information ihrer Kunden zu diesem Thema korrigiert werden.

Dank

Die Autoren bedanken sich bei den Landwirten, die am Projekt teilgenommen haben, und bei Isabelle Bertschy (Institut für Veterinär-Bakteriologie, Vetsuisse Fakultät, Universität Bern) für Assistenz bei den bakteriologischen Untersuchungen, sowie bei Prof. Dr. Andrea Endimiani und Dr. Salome N. Seiffert (Institut für Infektionskrankheiten, Medizinische Fakultät, Universität Bern) für die Analyse der ESBL-produzierenden Stämme. Wir danken Dr. Jens Becker für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Résistance des souches bactériennes isolées des fosses nasales de veaux d'élevage dans des exploitations laitières

Dans 52 exploitations laitières, 157 écouvillons ont été prélevés des fosses nasales de veaux d'élevage, desquels ont été isolés 56 *Escherichia coli*, 37 *Pasteurella multocida* et 8 *Mannheimia haemolytica*. Les profils de résistance de ces germes ont été déterminés par la mesure de la concentration minimale inhibitrice. Pour les *E. coli*, 55.3% des souches isolées montraient une résistance aux tétracyclines, 55.3% aux sulfamidés, 39.3% aux béta-lactamines, 30.3% aux aminoglycosides, 8.9% aux fluoroquinolones et 3.5% aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Les souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération présentaient un gène de béta-lactamase à spectre étendu *bla*_{CTX-M-14} et provenaient de deux exploitations dans lesquelles le lait de vaches sous traitement antibiotique était distribué aux veaux et où le cefquinome était utilisé comme antibiotique de premier recours pour le traitement des mammites. Pour *P. multocida*, 48.6% des souches étaient résistantes aux tétracyclines, 16.2% aux béta-lactamines et 5.4% chacun aux macrolides, aux aminoglycosides et aux sulfamidés. Les 8 isolats de *M. haemolytica* étaient sensibles à tous les antibiotiques testés.

Resistenze batteriche in batteri isolati dalle cavità nasali di vitelli provenienti da allevamenti da latte Svizzeri.

In 52 aziende di vacche da latte sono stati eseguiti 157 tamponi nasali da vitelli e da questi sono stati isolati 56 *Escherichia coli*, 37 *Pasteurella multocida* e 8 *Mannheimia haemolytica*. La suscettibilità di tali organismi agli antibiotici è stata valutata tramite la determinazione delle concentrazioni minime inibenti. Per *E. coli* il 55.3% dei ceppi isolati hanno mostrato resistenza alle tetracicline, il 55.3% ai sulfamidici, il 39.3% ai beta-lattamici, il 30.3% agli aminoglicosidi, l'8.9% ai fluorochinoloni e il 3.5% alle cefalosporine di terza generazione. I microrganismi identificati come resistenti alle cefalosporine di terza generazione, hanno rivelato il gene *bla*_{CTX-M-14}. Tali microrganismi sono stati tutti isolati in due aziende nelle quali si utilizza il latte proveniente da vacche sottoposte a trattamenti antibiotici per mastiti, per nutrire i vitelli. Per il trattamento delle suddette mastiti, l'antibiotico di scelta era il cefquinome. Per *P. multocida* il 48.6% dei ceppi erano resistenti alle tetracicline, il 16.2% ai beta-lattamici e il 5.4% ai macrolidi, aminoglicosidi e sulfamidici. Gli 8 isolati di *M. haemolytica* erano sensibili agli antibiotici testati.

Literatur

- Aebi M., van den Borne BHP, Raemy A., Steiner A., Pilo P., Bodmer M.*: *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. *Acta Vet. Scand.* 2015, 57: 10.
- Beer G., Doherr M.G., Bähler C., Meylan M.*: Antibiotikaeinsatz in der Schweizer Kälbermast. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2015, 157: 55–57.
- Büttner S., Mehmman M., Müntener C., Torriani K., Overesch G., 2014.* Bericht über den Vertrieb von Antibiotika in der Veterinärmedizin und das Antibiotikaresistenzmonitoring bei Nutztieren in der Schweiz (ARCH-VET 2013). Bundesamt für Veterinärwesen und Swissmedic, Bern, Switzerland: www.swissmedic.ch/archvet-d.asp.
- Catry B., Haesebrouck F., Vliegheer S. D., Feyen B., Vanrobaeys M., Opsomer G., Schwarz S., de Kruijff A. D.*: Variability in acquired resistance of *Pasteurella* and *Mannheimia* isolates from the nasopharynx of calves, with particular reference to different herd types. *Microb. Drug Resist.* 2005, 11: 387–394.
- Catry B., Dewulf J., Maes D., Pardon B., Callens B., Vanrobaeys M., Opsomer G., de Kruijff A., Haesebrouck, F.*: Effect of Antimicrobial Consumption and Production Type on Antibacterial Resistance in the Bovine Respiratory and Digestive Tract. *PLoS One*, 2016, 11: e0146488.
- CLSI 2015:* Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed. CLSI Suppl. VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- Duse A., Persson Waller K., Emanuelson U., Ericsson Unnerstad H., Persson Y., Bengtsson B.*: Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2015, 98: 500–516.
- EUCAST 2016:* The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>.
- Khachatourians G. G.*: Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Can. Med. Assoc. J.* 1998, 159: 1129–1136.
- Langford F. M., Weary D. M., Fisher L.*: Antibiotic Resistance in Gut Bacteria from Dairy Calves: A Dose Response to the Level of Antibiotics Fed in Milk. *J. Dairy Sci.* 2003, 86: 3963–3966.
- Lava M., Pardon B., Schüpbach-Regula G., Keckeis K., Deprez P., Steiner A., Meylan M.*: Effect of calf purchase and other herd-level risk factors on mortality, unwanted early slaughter, and use of antimicrobial group treatments in Swiss veal calf operations. *Prev. Vet. Med.* 2016a, 126: 81–88.
- Lava M., Schüpbach-Regula G., Steiner A., Meylan M.*: Antimicrobial drug use and risk factors associated with treatment incidence and mortality in Swiss veal calves reared under improved welfare conditions. *Prev. Vet. Med.* 2016b, 126: 121–130.
- Luginbühl A., Bähler C., Steiner A., Kaufmann T., Ewy A.*: Results of herd health management in veal calf production. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2012, 154: 277–285.
- Mosier D. A.*: Bacterial pneumonia. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1997, 97: 720–749.
- Nedbalcova K., Nechvatalova K., Pokludova L., Bures J., Kuvorova Z.*: Resistance to selected betalactam antibiotics. *Prev. Vet. Med.* 2014, 171: 328–336.
- Pipoz F., Meylan M.*: Gesundheit und Antibiotikaverbrauch bei Aufzuchtälbern in Milchviehbetrieben: Management, Prävalenz von Kälberkrankheiten und Behandlungen. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2016, 158: 389–396.
- Rérat M., Albini S., Jaquier V., Hüsey D.*: Bovine respiratory disease: Efficacy of different prophylactic treatments in veal calves and antimicrobial resistance of isolated *Pasteurella* spp. *Prev. Med. Vet.* 2012, 103: 265–273.
- Schwarz S., Silley P., Simjee S., Woodford N., van Duikeren E., Johnson A.P., Gaastra W.*: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010, 65: 601–604.
- Seiffert S. N., Hilty M., Perreten V., Endimiani A.*: Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug. Resist. Updat.* 2013, 16: 22–45.
- Strategie Antibiotikaresistenzen StAR, Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, 2015:* <http://www.bag.admin.ch/themen/medizin/14226/index.html?lang=de>.
- Thomas C. M., Nielsen K. M.*: Mechanisms of, and barrier to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* 2005, 3: 711–721.
- Vogel G., Nicolet J., Martig J., Tschudi P., Meylan M.*: Kälberpneumonien: Aktualisierung des bakteriellen Erregerspektrums und der Resistenzlage gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen, Schweiz. Arch. Tierheilk. 2001, 143: 341–350.
- Vogt D., Overesch G., Endimiani A., Collaud A., Thomann A., Perreten V.*: Occurrence and genetic characteristics of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Swiss retail meat. *Microb. Drug Resist.* 2014, 20: 485–94.
- WHO 1997. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals. http://www.who.int/whr/1997/en/whr97_en.pdf?ua=1.
- WHO, 2012. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 3rd revision 2011. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf.

Korrespondenz

Mireille Meylan
Wiederkäuferklinik
Vetsuisse-Fakultät Bern
Bremgartenstrasse 109a
CH-3012 Bern
Telefon: +41(0)31 631 23 44
Fax: +41(0)31 631 26 31
E-Mail: mireille.meylan@vetsuisse.unibe.ch