

Aus dem
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Multiresistente Enterobakterien bei neugeborenen Milchviehkälbern in Sachsen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Jil Karlotta Waade
aus Fürth

Leipzig, 2021

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches

Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand, Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 19.10.2021

Meiner Familie

Inhalt

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	2
2.1	Antimikrobielle Resistenzen.....	2
2.1.1	Entstehung antimikrobieller Resistenzen	2
2.1.2	Resistenzmechanismen	3
2.1.3	Verbreitung von Resistenzen	5
2.2	Beta-Laktamantibiotika	8
2.2.1	Penicilline	8
2.2.2	Cephalosporine.....	9
2.2.3	Carbapeneme und Monobactame.....	10
2.2.4	β -Laktamasehemmer	10
2.2.5	Bakterielle Resistenzmechanismen gegenüber Beta-Laktamen	10
2.3	Beta-Laktamasen.....	10
2.3.1	Klassifikation	12
2.3.2	Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen	14
2.4	Vorkommen und Verteilung von ESBL bei Nutztieren und ihr zoonotisches Potenzial	17
2.5	Nachweis und Identifikation von ESBL	19
2.5.1	Phänotypischer Nachweis.....	19
2.5.2	Genotypische Identifikation	20
3	Veröffentlichung.....	21
4	Diskussion	42
5	Zusammenfassung	47
6	Summary	49
7	Literaturverzeichnis.....	51
8	Danksagung	61

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inaktivierung von β -Laktamen durch Spaltung des Laktamrings.....11

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktionelle Klassifikation der β -Laktamasen 13

Tabelle 2: Hemmhofdurchmesser für einen positiven Screening-Test
mittels Agardiffusion20

III. Abkürzungsverzeichnis

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMT	Complex Mutants of TEM
ESBL	Extended-Spectrum β -Laktamasen
ESBL-E	ESBL-produzierende Enterobakterien
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ICE	Integrative conjugative elements
IRT	Inhibitor-resistente TEM
kbp	Kilobasenpaar
MHK	Minimale Hemmkonzentration
PBP	Penicillin-bindende Proteine
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

Antimikrobielle Resistenz ist ein weltweites Anliegen, das in den letzten zehn Jahren immer mehr in den Fokus gerückt ist. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht sogar so weit, vor einer postantibiotischen Ära zu warnen, in der gewöhnliche Infektionen wieder lebensbedrohlich sein werden (WHO 2015). Das Auftreten multiresistenter Bakterien in der Bevölkerung und in Krankenhäusern sowie in der Tierhaltung hat seit den 1990er Jahren exponentiell zugenommen. MRSA ist seit Jahren ein altbekanntes Problem, und es wurden große Fortschritte bei der Reduzierung seiner Prävalenz erzielt (KÖCK und CUNY 2018). Das zunehmende Auftreten multiresistenter gramnegativer Bakterien, insbesondere der Familie *Enterobacteriaceae* wie *K. pneumoniae*, *Enterococcus* spp. und *E. coli*, gibt zunehmenden Anlass zur Sorge und ist weltweit Gegenstand zahlreicher Studien. Der Hauptresistenzmechanismus bei gramnegativen Bakterien ist die Produktion von Extended-Spectrum Beta-Laktamasen (ESBL), Enzymen, die in der Lage sind, Penicilline und Cephalosporine, einschließlich der Breitband-Cephalosporine, zu hydrolysieren. Letztere werden von der WHO als „critically important antimicrobials“ eingestuft, die sogenannten Reserveantibiotika (WHO 2017). Eine Übertragung ESBL-produzierender Bakterien von Mensch auf Tier über direkten Kontakt oder den Verzehr kontaminierten Fleisches ist möglich und wird kontrovers diskutiert. In den letzten Jahren nahm daher die Anzahl an Studien zum Vorkommen und der Charakterisierung ESBL-produzierender Bakterien bei Nutztieren stetig zu. Durch große regionale Unterschiede in Betriebsstruktur und -management und zum Teil stark variierende Haltungssysteme je nach Produktionsrichtung und Altersstufe ist allerdings gerade in der Rinderhaltung eine sehr differenzierte Betrachtung der ESBL-Prävalenzen vonnöten (HILLE et al. 2014). In den neuen Bundesländern sind die Strukturen der ehemaligen DDR mit sehr großen, intensiv geführten Tierhaltungen noch weitgehend existent und einzigartig in Deutschland (MERLE et al. 2012). Bislang gibt es kaum Studien zum Vorkommen von ESBL in dieser Region. Ziel dieser Arbeit war deshalb, Betriebs- und Einzeltierprävalenzen ESBL-produzierender Enterobakterien (ESBL-E) bei neugeborenen Milchviehkälbern in Sachsen zu untersuchen und charakterisieren und auf das Vorhandensein weiterer Antibiotikaresistenzen zu prüfen.

2 Literaturübersicht

2.1 Antimikrobielle Resistenzen

Antibiotikaresistenz wird definiert, als die Fähigkeit eines Mikroorganismus, einer normalerweise wirksamen Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes zu widerstehen und sich weiterhin vermehren zu können. Es wird zwischen einer primären (intrinsischen) und sekundären (erworbenen) Resistenz unterschieden.

Primäre Resistenzen treten natürlicherweise bei allen Vertretern einer taxonomischen Gruppe auf. Dies kann ein ganzes Genus betreffen, eine Spezies oder Subspezies. Sie ergeben sich zumeist aus strukturellen oder biochemischen Eigenschaften der Mikroorganismen. Beispielsweise sind viele gramnegative Bakterien resistent gegenüber Aminoglykosiden, da diese relativ großen Moleküle schlichtweg nicht in der Lage sind, die Zellwand zu passieren.

Erworbene Resistenzen entstehen aus einer genetischen Modifikation des normalerweise empfindlichen Organismus. Dies kann über die Mutation von Haushaltsgenen erfolgen, die für physiologische Prozesse oder strukturelle Eigenschaften codieren, über die Aufnahme fremder Resistenzgene oder einer Kombination aus beidem (BOERLIN und WHITE 2013).

2.1.1 Entstehung antimikrobieller Resistenzen

Das Auftreten von Resistenzgenen ist ein natürlich vorkommendes Phänomen in der Bakterienpopulation. Einige Jahre bevor Penicillin überhaupt auf dem Markt eingeführt wurde, konnte das Team um Alexander Fleming bereits im Jahr 1940 eine Penicillinase nachweisen. Durch den steigenden Einsatz von Antibiotika hat sich der Selektionsdruck erhöht und die evolutionäre Entwicklung spezifischer und hochpotenter resistenzvermittelnder Enzyme beschleunigt (DAVIES und DAVIES 2010).

Die hochspezifischen Resistenzgene der heutigen Zeit stammen wahrscheinlich von Vorgängergenen ab, die ursprünglich für andere biochemische Vorgänge codiert haben, möglicherweise gleichzeitig aber eine moderate Antibiotikaresistenz vermittelt haben. β -Laktamasen beispielsweise haben sich aus Penicillin-bindenden Proteinen (PBP) entwickelt. Der bestehende Selektionsdruck hat aus einer Zielstruktur eines Antibiotikums ein Enzym

entstehen lassen, das in der Lage ist, den selben Wirkstoff zu inaktivieren (MASSOVA und MOBASHERY 1998, WRIGHT 2007).

Umweltkeime, die selbst antibiotisch wirksame Metaboliten produzieren, gelten als „Hot Spots“ für die Evolution von Resistenzen (WRIGHT 2007). D'COSTA et al. konnten nachweisen, dass Resistenzgene bereits seit Jahrtausenden in den Bakterienpopulationen zirkulieren. Sie untersuchten Proben aus kanadischen Permafrostböden, die auf rund 30.000 Jahre vor unserer Zeit zurückdatiert werden konnten, und fanden diverse Gene, die Resistenzen gegenüber β -Laktamen, Tetrazyklinen und Aminoglykosiden vermitteln.

2.1.2 Resistenzmechanismen

Es können 4 Hauptgruppen von Resistenzmechanismen unterschieden werden:

(1) Modifikation des Wirkstoffs

Eine der erfolgreichsten Strategien der Antibiotikaresistenz ist die Produktion von Enzymen, die das Antibiotikum wirkungslos machen. Dies kann durch eine chemische Modifikation, wie Acetylierung, Phosphorylierung oder Adenylierung erfolgen, sodass der Wirkstoff nicht mehr an seiner Zielstruktur binden kann (MUNITA und ARIAS 2016). Aminoglykoside sind hierfür besonders empfänglich, da es sich um große Moleküle mit vielen exponierten Hydroxyl- und Amidgruppen handelt (BLAIR et al. 2015).

Die hydrolytische Spaltung eines Wirkstoffes tritt insbesondere bei den β -Laktamen auf und wird in Kapitel 2.3 näher beschrieben.

(2) Verringerung der intrazellulären Wirkstoffkonzentration

Eine verminderte Konzentration des Wirkstoffs in der Bakterienzelle wird entweder durch eine reduzierte Aufnahme oder das gesteigerte Ausschleusen der Substanz aus der Zelle erreicht (VALENTIN-WEIGAND 2015).

Die meisten *Enterobacteriaceae* besitzen Porine in ihrer äußeren Membran, sogenannte outer-membrane proteins wie OmpF und OmpC bei *E. coli*. Diese Proteine sind wenig spezifisch und erlauben Antibiotika daher leicht in die Zelle zu gelangen. Eine Downregulation

der Porine oder ein Austausch mit selektiveren Kanälen lässt die Permeabilität der äußeren Membran sinken und limitiert das Anfluten von Wirkstoff.

Efflux-Pumpen transportieren Stoffe aktiv aus den Bakterienzellen und sind eine der Hauptursachen der intrinsischen Aktivität bei gramnegativen Erregern. Manche dieser Pumpen haben ein enges Wirkspektrum, beispielsweise Tet-Pumpen. Multidrug resistance (MDR)-Pumpen dagegen transportieren ein weites Spektrum an Stoffen aus der Zelle. Durch Überexpression der Transportproteine können somit keine wirksamen Wirkstoffkonzentrationen aufgebaut werden. Einige der normalerweise chromosomal vorliegenden Gene konnten bereits auf Plasmiden nachgewiesen werden, sodass dieser Mechanismus mittlerweile auch eine wichtige Rolle bei der erworbenen Resistenz spielt (BLAIR et al. 2015).

(3) Modifikation von Zielstrukturen

Die meisten Zielstrukturen für Antibiotika sind hochspezifisch. Durch die Bindung des Wirkstoffs kommt es zu einer Unterbindung der üblichen Aktivität der Zielstruktur. Werden diese verändert, aber nicht in ihrer normalen Funktion gehindert, entstehen Resistenzen.

Dies kann sowohl auf genetischer Ebene passieren als auch durch biochemische Modifikation. Aminoglykoside beispielsweise hemmen die bakterielle Proteinsynthese, indem sie an den Ribosomen binden. Durch Methylierung der Bindungsstelle kann das Antibiotikum nicht mehr angreifen und wird wirkungslos (BLAIR et al. 2015).

Außerdem können Bakterien in der Lage sein, Zielstrukturen so zu ersetzen, dass die biochemische Funktion erhalten bleibt, das Ziel aber nicht durch den Wirkstoff inaktiviert werden kann. Eine weitere Möglichkeit der Resistenzentwicklung ist die simple Überexpression der Zielstruktur, beispielsweise bei Sulfonamiden und Trimethoprim (MUNITA und ARIAS 2016).

(4) Entwicklung alternativer Stoffwechselwege

Durch die Evolution resistenter Stoffwechselwege können sich Bakterien ebenfalls vor Antibiotika schützen (VALENTIN-WEIGAND 2015). Dieser Resistenzmechanismus wird unter anderem gegenüber Sulfonamiden und Trimethoprim wirksam, indem Bakterien resistente Dihydropteroatsynthasen (Zielstruktur für Sulfonamide) und Dihydrofolatreduktasen

(Zielstruktur für Trimethoprim) produzieren und der Folsäurestoffwechsel so nicht gehemmt wird (MC DERMOTT et al. 2003).

2.1.3 Verbreitung von Resistenzen

Bakterien sind in der Lage, ihre Gene sowohl vertikal als auch horizontal weiterzugeben. Mutationen in chromosomaler DNA können nur vertikal übertragen werden und setzen sich nur durch, wenn ein konstanter Selektionsdruck vorhanden ist, da sie meist mit hohen Kosten zulasten der bakteriellen Fitness einhergehen (MUNITA und ARIAS 2016, VALENTIN-WEIGAND 2015).

Der weitaus effektivere Weg der Resistenzverbreitung ist der horizontale Gentransfer (HGT). Hierbei werden drei Übertragungsarten unterschieden:

(1) Transformation

Die Aufnahme „nackter“ DNA aus der Umwelt ist die einfachste Art des Gentransfers. Fähig sind hierzu allerdings nur wenige klinisch relevante Spezies (MUNITA und ARIAS 2016). Bakterien müssen in einen Zustand der Kompetenz gelangen, um das DNA-Molekül in ihr Zytoplasma aufnehmen zu können und es anschließend in ihr Genom zu integrieren. Dieser zeitlich begrenzte Zustand ist abhängig von verschiedenen Umweltfaktoren, wie Wachstumsbedingungen, Nährstoffverfügbarkeit und Populationsdichte (THOMAS und NIELSEN 2005). Transformation kann nur innerhalb nahe verwandter Spezies stattfinden.

(2) Transduktion

Transduktion bezeichnet die Übertragung von Genen durch Bakteriophagen. Dabei injizieren sie ihre DNA in die Bakterienzelle, wodurch die Replikationssysteme der Empfängerzelle direkt neue Phagenpartikel entstehen und durch Zelllyse in die Umwelt freigegeben werden. Alternativ kann die Phagen-DNA in die Empfänger-DNA integriert werden und erst zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert werden (Lysogenie). Dabei wird sowohl Phagen- als auch Bakterien-DNA repliziert. Beim Aufbau neuer Phagen kann versehentlich ein Resistenzgen verpackt werden und als Pseudophage auf eine andere Bakterienzelle übertragen werden.

Auch die Transduktion kann nur innerhalb nahe verwandter Spezies stattfinden (SCHWARZ et al. 2006).

(3) Konjugation

Die Übertragung von genetischem Material einer Spenderzelle auf eine Empfängerzelle mittels direktem Zellkontakt wird als Konjugation bezeichnet. Übertragen werden können konjugative Plasmide und Transposons (auch integrative conjugative elements, kurz ICE, genannt), die über eine *tra*-Region verfügen und so die Konjugationsmechanismen steuern können. Nicht-konjugative mobile Elemente können den Transferapparat konjugativer Elemente nutzen, solange sie selbst eine *oriT*-Region (origin of transfer) besitzen. Dieser Vorgang wird als Mobilisation bezeichnet (SCHWARZ et al. 2006).

Die Übertragung findet nur in eine Richtung vom Spender zum Empfänger statt. Die Spenderzelle nimmt über den Pilus Kontakt mit der Empfängerzelle auf, die beiden Zellen nähern sich an und bilden eine stabile Plasmabrücke. Das Plasmid wird im *oriT* gespalten und ein Einzelstrang mit 5'-Ende wird auf die Empfängerzelle transferiert (SCHMIDT 2017).

In den meisten Fällen werden Resistenzgene mittels Konjugation übertragen. Das genetische Material wird, im Gegensatz zur Transformation, vor der Umwelt geschützt transferiert und der Vorgang geht zielgerichteter von statten als die Transduktion (WINTERSDORFF et al. 2016). Auch ist die Konjugation zwischen einem breiten Spektrum von Bakterienarten möglich.

Über horizontalen Gentransfer erhaltenes Genmaterial kann durch Rekombination stabil in das Wirtsgenom integriert werden oder extrachromosomal auf Plasmiden verbleiben.

Die Übertragung von Resistenzgenen erfolgt mithilfe mobiler genetischer Elemente wie Plasmiden, Transposons, Integrons und Genkassetten. Sie bestehen alle auf doppelsträngiger DNA, unterscheiden sich aber in ihrer Größe, Struktur, biologischen Eigenschaften und ihren Verbreitungsmechanismen.

(1) Plasmide

Plasmide sind in der Lage, sich autonom zu replizieren. Sie liegen extrachromosomal als ringförmiger DNA-Doppelstrang in der Bakterienzelle vor. Ihre Größe variiert zwischen weniger als 2 und mehr als 100 Kilobasenpaaren (kbp). Plasmide können Resistenzen

gegenüber diversen Substanzen, wie Antibiotika, Desinfektionsmittel und Schwermetallen vermitteln, aber auch für Bacteriocine, Virulenzfaktoren oder alternative Stoffwechselwege codieren (SCHWARZ et al. 2006). In einer Bakterienzelle können verschiedene Plasmide vorliegen, solange sie zu unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen (*Inc*-Gruppen) gehören.

(2) Transposons

Transposons sind die kleinsten mobilen Elemente. Sie sind nicht zur autonomen Replikation fähig, sondern nutzen die Replikationsmechanismen der Chromosomen oder Plasmide, in die sie integriert sind.

Während zusammengesetzte Transposons zusätzliche Gene enthalten, die unter anderem Antibiotikaresistenzen vermitteln, bestehen einfache Transposons lediglich aus einer Insertionssequenz. Sie können aber ebenso Resistenzen auslösen, indem sie die Expression benachbarter Gene beeinflussen, sie mobilisieren oder schlicht inaktivieren (BROWN-JAQUE et al. 2015).

(3) Genkassetten und Integrons

Genkassetten sind kleine, mobile genetische Elemente, die meist nicht länger sind als 2 kbp. Sie bestehen aus einer Rekombinationsstelle und einem einzelnen Gen. Genkassetten besitzen nicht die Fähigkeit der autonomen Replikation oder Transposition, sondern bewegen sich mittels Orts-spezifischer Rekombination. Meist sind sie Teil von Integrons (SCHWARZ et al. 2006).

Die Struktur eines Integrons besteht aus einer variablen Anzahl von Genkassetten und einer konservierten Region aus einer Integrase, einer Rekombinationsstelle und einem Promotor. Genkassetten werden mittels Orts-spezifischer Rekombination in das Integron aufgenommen, wobei nur die Gene, die der Promotorsequenz am nächsten liegen, exprimiert werden. Die Anzahl und Anordnung der Genkassetten in einem Integron ist variabel (ESCUDERO et al. 2015).

2.2 Beta-Laktamantibiotika

Eine der wichtigsten und am häufigsten genutzten Antibiotikagruppen in der Veterinärmedizin sind die β -Laktame. Sie stören die Zellwandsynthese, indem sie bei Bakterien in der Wachstumsphase das Endstadium der Murein-Synthese hemmen. β -Laktame binden irreversibel an Penicillin-bindende Proteine (PBP) wie die Mureinsynthase, die das Peptidoglykanskelett der Zellwand aufbaut. Durch die Inhibition des Enzyms entstehen Unregelmäßigkeiten in der Zellwand und es kommt durch Autolyse und eine gestörte Osmose zum Anschwellen und Platzen der Bakterienzelle (RICHTER und LÖSCHER 2016).

Zu den Beta-Laktamantibiotika zählen die Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Monobactame, sowie Beta-Laktam-Inhibitoren.

2.2.1 Penicilline

Benzylpenicillin (Penicillin G) war der erste natürlich vorkommende Vertreter in der Klasse der Penicilline, wies aber einige Nachteile in der klinischen Anwendung auf. Es war wenig säurestabil und demnach oral unwirksam, wies eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Penicillinasen auf und war unwirksam gegenüber klinisch relevanter gramnegativer Bakterien (PRESCOTT 2013a). In den folgenden Jahren wurden semisynthetische Abkömmlinge des Benzylpenicillins entwickelt, um diese Nachteile zu kompensieren. Heute werden verschiedene Untergruppen nach Wirkungsspektrum und -dauer und der Penicillinase- und Säurestabilität unterschieden.

Depot-Penicilline, wie Benzylpenicillin-Procaïn, haben im Vergleich zum Benzylpenicillin eine verlängerte Wirkungsdauer. Durch den Ersatz des Natrium- oder Kalium-Ions mit einem nicht metallischen Kation wie Procaïn ist die Löslichkeit des Moleküls stark reduziert, sodass der Wirkstoff nach Injektion nur langsam resorbiert werden kann. Phenoxymethyl-Penicilline sind säurestabil und somit auch für die orale Verabreichung geeignet. (RICHTER und LÖSCHER 2016).

Die in der Tiermedizin am häufigsten genutzten Penicilline sind die sogenannten „Breitband-Penicilline“ wie Ampicillin und Amoxicillin. Durch das Einführen einer Aminogruppe am Benzylrest, konnte das Wirkungsspektrum auf gramnegative Bakterien erweitert werden, resistent bleiben weiterhin *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* und einige Proteus-Stämme.

Sie verfügen über eine sehr gute Verträglichkeit und sind stabil gegenüber Magensäure (POTSCHKA et al. 2014).

Isoxazolylpenicilline weisen eine erhöhte Stabilität gegenüber β -Lactamasen auf. Sie werden vor allem gegen β -Lactamase-produzierende Staphylokokken eingesetzt, während ihre Potenz gegenüber anderer Benzylpenicillin-empfindlicher Bakterien reduziert ist. Veterinärmedizinische Vertreter sind Oxacillin und Cloxacillin, die vor allem intramammär zur Mastitistherapie oder als Uterusstäbe eingesetzt werden (RICHTER und LÖSCHER 2016).

2.2.2 Cephalosporine

Cephalosporine sind halbsynthetische Derivate der 7-Aminocephalosporansäure. In ihrem Wirkungsmechanismus unterscheiden sie sich kaum von dem der Penicilline. Abhängig von ihrem Wirkungsspektrum und der Stabilität gegenüber β -Laktamasen werden sie in 4 Generationen eingeteilt (POTSCHKA et al. 2014).

Das Wirkungsspektrum der Cephalosporine 1. Generation richtet sich vor allem gegen grampositive Kokken. Sie weisen nur eine schwache oder gar keine Wirkung gegenüber gramnegativen Erregern auf. In der Veterinärmedizin werden sie hauptsächlich lokal (Cefapirin, Cefalonium) oder oral (Cefalexin) eingesetzt.

Cephalosporine der 2. Generation werden derzeit in der Veterinärmedizin nicht angewendet. Sie besitzen ein uneinheitliches Wirkungsspektrum, das etwas breiter gegenüber gramnegativen Bakterien ist.

Vertreter der 3. und 4. Generation werden aufgrund ihrer erweiterten Wirksamkeit gegenüber Gramnegativen auch als Breitspektrum-Cephalosporine bezeichnet. Daneben zeichnen sie sich durch eine erhöhte β -Laktamase-Stabilität aus. Substanzen der 3. Generation wie Cefoperazon, Ceftiofur und Cefovecin weisen eine variable Wirksamkeit gegenüber *Pseudomonas* auf, während sie bei Cefquinom, einem Cephalosporin der 4. Generation, verbessert ist (RICHTER und LÖSCHER 2016).

2.2.3 Carbapeneme und Monobactame

Carbapeneme mit den Vertretern Imipenem und Meropenem gehören zu den Antibiotika mit dem breitesten Wirkungsspektrum gegenüber grampositiven, wie gramnegativen Bakterien. Sie sind weitestgehend resistent gegenüber β -Laktamasen, mit Ausnahme der Carbapenemasen, die in den letzten Jahren einen rasanten Anstieg erfahren (PRESCOTT 2013b).

Das Monobactam Aztreonam zeichnet sich durch ein breites Wirkungsspektrum gegenüber gramnegativen Bakterien aus, während es gegenüber Grampositiven und Anaerobiern wirkungslos ist (PRESCOTT 2013b).

Carbapeneme und Monobactame gelten aufgrund ihres Wirkungsspektrums und der günstigen Resistenzsituation als Reserveantibiotika und sind in der Veterinärmedizin nicht verfügbar. Auf Umwidmungen zur Anwendung am Tier sollte möglichst verzichtet werden (POTSCHKA et al. 2014).

2.2.4 β -Laktamasehemmer

β -Laktamasehemmer wie Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam besitzen zwar ebenfalls einen β -Laktamring, haben aber nur eine geringe bakterizide Wirkung. Ihre Fähigkeit, irreversibel und hochaffin an β -Laktamasen zu binden, wird in der Kombination mit Penicillinen und Cephalosporinen genutzt, indem die Enzyme durch β -Laktamasehemmer blockiert werden und das zweite β -Laktam ungehindert seine Wirkung entfalten kann (PRESCOTT 2013b). Die in der Veterinärmedizin am häufigsten eingesetzte Kombination ist Amoxicillin-Clavulansäure.

2.2.5 Bakterielle Resistenzmechanismen gegenüber Beta-Laktamen

2.3 Beta-Laktamasen

β -Laktamasen sind von grampositiven wie gramnegativen Bakterien gebildete Enzyme mit der Fähigkeit, β -Laktam-Antibiotika unwirksam zu machen. Sie sind für die intrinsische und erworbene Resistenz gegenüber β -Laktamen von großer Bedeutung, vor allem bei

gramnegativen Erregern (LI et al. 2007), und ein häufiger Grund für Therapieversagen in der Human- und Veterinärmedizin.

Evolutionsgeschichtlich entstanden β -Laktamasen wahrscheinlich bereits vor rund 2 Milliarden Jahren, noch bevor grampositive und -negative Bakterien sich differenzierten (HALL und BARLOW 2004).

Biochemisch betrachtet lassen sich β -Laktamasen zur Gruppe der Proteasen zuordnen. Sie sind in der Lage, den β -Laktamring von Penicillinen, Cephalosporinen und Carbapenemen zu hydrolysieren und ihre antibakterielle Wirkung zu inaktivieren. Bei gramnegativen Bakterien sind sie zumeist im periplasmatischen Raum lokalisiert (LIVERMORE 1995).

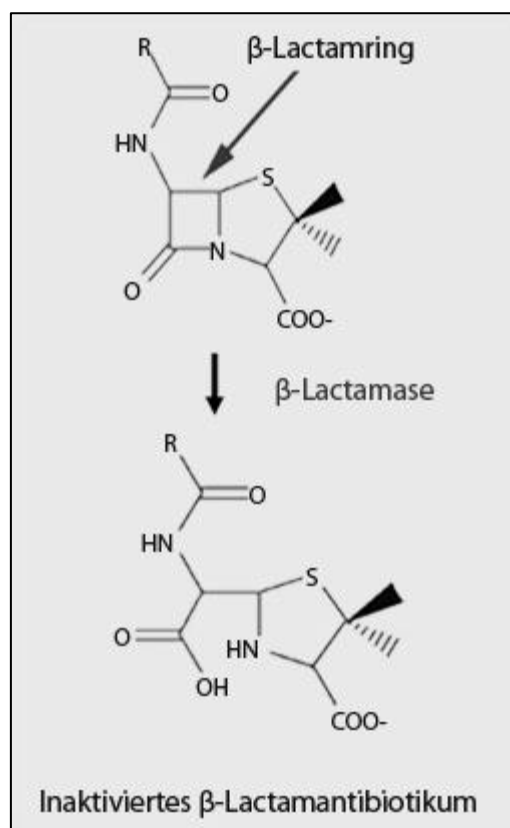


Abbildung 1: Inaktivierung von β -Laktamen durch Spaltung des Laktamrings (übernommen aus FAULER 2014)

Resistenzgene für β -Laktamasen sind sowohl chromosomal, als auch auf Plasmiden zu finden. Der horizontale Gentransfer spielt in der Übertragung von β -Laktam-Resistenzen eine große Rolle und ist hauptverantwortlich für die rasante Verbreitung weltweit (PRESCOTT 2013b).

Die drei klinisch wichtigsten, schnell wachsenden Gruppen der β -Laktamasen sind die Metalloenzyme, AmpC-Enzyme und Extended-Spektrum β -Laktamasen (ESBL) (THEURETZ-BACHER 2006). Letztere werden im Kapitel 2.3.2 näher beschrieben.

2.3.1 Klassifikation

Seit ihrer ersten Entdeckung wurden β -Laktamasen auf verschiedenste Weise klassifiziert. Dabei wurden einzelne biochemische Eigenschaften der Enzyme zu Rate gezogen, wie die molekulare Masse, der isoelektrische Punkt, der Aufbau des aktiven Zentrums, die Aminosäuresequenz, die dreidimensionale Struktur, das Substratprofil und die Interaktion der Enzyme mit Inhibitoren (AMBLER 1980). Im Folgenden werden die beiden bis heute verwendeten Klassifikationen näher erläutert.

1980 wurden von AMBLER 2 Klassen β -Laktamasen nach dem Aufbau ihres aktiven Zentrums unterschieden. Klasse A als Serinproteasen und Klasse B als Metalloproteasen, die ein zweiwertiges Zink-Ion benötigen, um ihre Aktivität entfalten zu können. Eine zweite Gruppe Serin- β -Laktamasen, die nur wenig Gemeinsamkeiten in ihrer Aminosäuresequenz mit den Enzymen der Klasse A aufwies, wurde 1981 entdeckt und als Klasse C in die Nomenklatur eingeführt (JAURIN und GRUNDSTROM 1981). Heute auch bekannt als AmpC β -Laktamasen. 1987 konnte sich analog eine weitere Gruppe Serin- β -Laktamasen, die OXA β -Laktamasen, als Klasse D durchsetzen (OUELLETTE et al. 1987). Die von AMBLER ursprünglich eingeführte Klasse A enthält heute die TEM-, SHV-, CTX-M- und einige weitere, seltener vorkommende β -Laktamasen .

Einige Enzyme der Metallo- β -Laktamasen weisen ebenfalls nur wenig Homologie auf und lassen analog zu den Serin- β -Laktamasen eine separate phylogenetische Entwicklung vermuten. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren Forderungen laut, die Klasse B in die Subgruppen B1 bis B3 zu unterteilen (HALL und BARLOW 2005).

Die molekulare Klassifikation nach Ambler ist zwar sehr objektiv, für eine klinisch-diagnostische Anwendung ist sie aber nur begrenzt von Nutzen. Ende der 80er-Jahre wurde zu diesem Zweck eine funktionelle Einteilung veröffentlicht, die mit Entdeckung neuer β -Laktamasen über die Jahre weiterentwickelt und verfeinert wurde (BUSH 1989, BUSH et al. 1995, BUSH und JACOBY 2010).

Die Klassifikation nach Bush und Jacoby berücksichtigt Substratprofile und die potenzielle Hemmbarkeit durch β -Laktamase-Inhibitoren. Es werden 3 Gruppen mit diversen Subgruppen unterschieden:

- (1) Gruppe 1: Cephalosporinasen (Ambler Klasse C), die resistent gegenüber β -Laktamase-Inhibitoren sind

- (2) Gruppe 2: Serin- β -Laktamasen der Ambler Klasse A und D, die im Allgemeinen empfindlich gegenüber β -Laktamase-Inhibitoren sind
- (3) Gruppe 3: Metallo- β -Laktamasen (Ambler Klasse B), die resistent gegenüber β -Laktamasen, aber empfindlich gegenüber Metallchelatoren wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) sind

Eine vierte Gruppe von Penicillinasen, die resistent gegenüber β -Laktam-Inhibitoren ist, wurde in der aktualisierten Klassifikation von 2010 nicht mehr berücksichtigt. Die eingeschlossenen Enzyme würden aller Wahrscheinlichkeit nach in eine der anderen Gruppen klassifiziert, wären sie von den Erstbeschreibern vollständig charakterisiert worden (BUSH und JACOBY 2010).

Die weitere Einteilung in Subgruppen ist in Tabelle 1 veranschaulicht.

Tabelle 1: Funktionelle Klassifikation der β -Laktamasen nach BUSH und JACOBY 2010

Bush-Jacoby-Gruppe (2010)	Ambler-Klasse	Substratprofil	Inhibition	Vertreter
1	C	Cephalosporine	Keine	<i>E. coli</i> AmpC, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cephalosporine	Keine	CMY-10, CMY-19
2a	A	Penicilline	β -Laktam-Inhibitoren	PC1
2b	A	Penicilline, frühe Cephalosporine	β -Laktam-Inhibitoren	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Breitband-Cephalosporine, Monobactame	β -Laktam-Inhibitoren	TEM- und SHV-ESBLs, CTX-M
2br	A	Penicilline	Keine	TEM-30, TEM-31
2ber	A	Breitband-Cephalosporine, Monobactame	Keine	TEM-50 (CMT-1)

2c	A	Carbenicillin	β -Laktam-Inhibitoren	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicillin, Cefepim	z.T. β -Laktam-Inhibitoren	RTG-4 (CARB-10)
2d	D	Cloxacillin	z.T. β -Laktam-Inhibitoren	OXA-1, OXA-10
2de	D	Breitband-Cephalosporine, Cloxacillin	z.T. β -Laktam-Inhibitoren	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapeneme	z.T. β -Laktam-Inhibitoren	OXA-23, OXA-48
2e	A	Breitband-Cephalosporine	β -Laktam-Inhibitoren	CepA
2f	A	Carbapeneme	z.T. β -Laktam-Inhibitoren	KPC-2, IMI-1
3a	B	Carbapeneme	EDTA	IMP-1, VIM-1
3b	B	Carbapeneme	EDTA	CphA, Sfh-1

2.3.2 Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen

β -Laktamasen mit einem **erweiterten Spektrum (ESBL)** entstanden durch Punktmutationen klassischer, für β -Laktamasen codierender Resistenzgene (*bla*-Gene), wie TEM-1, TEM-2 und SHV-1. Durch eine daraus resultierende Modifikation in der Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums, sind sie in der Lage, auch Breitband-Cephalosporine unwirksam zu machen. Sie können durch β -Laktam-Inhibitoren wie Clavulansäure, Tazobactam und Sulbactam gehemmt werden (THEURETZBACHER 2006).

Die ersten ESBL traten nicht lange nach der Einführung von Oxyiminocephalosporinen auf. 1985 wurde ein Mutant der SHV-1 β -Laktamase von KLIEBE et al. beschrieben, der in der Lage war, Cephalosporine der 3. Generation zu hydrolysieren. In den letzten 20 Jahren

konnten immer größere Zahlen dieser Enzyme charakterisiert werden. Auch andere, evolutionsgeschichtlich nicht von TEM und SHV abstammende ESBL der CTX-M-Familie und Mutanten der OXA-Enzyme, erfuhren eine rasante Entwicklung (LIVERMORE 2008).

Die TEM-ESBL stammen von TEM-1 und TEM-2 ab. TEM-1 wurde 1965 in Athen erstbeschrieben, aus einem *E. coli*-Isolat einer Patientin namens Temoniera (DATTA und KONTOMICHALOU 1965). In den frühen 1970er Jahren war TEM-1 bereits bei 30-50 % der *E. coli*-Isolate nachweisbar und wurde zur häufigsten β -Laktamase gramnegativer Bakterien (LIVERMORE 2008). TEM-2 unterscheidet sich nur in seinem isoelektrischen Punkt von TEM-1. Die erste TEM-ESBL wurde 1987 von SIROT et al. in Frankreich beschrieben und aufgrund ihrer verstärkten Aktivität gegenüber Cefotaxim vorerst CTX-1 genannt. Später wurde CTX-1 zu TEM-3 umbenannt, da es sich in nur 2 Aminosäuren von TEM-2 unterschied (SOUGAKOFF et al. 1988).

Einige TEM-Derivate besitzen eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber β -Laktam-Inhibitoren und werden Inhibitor-resistente TEM (IRT) genannt. Sie wurden Anfang der 1990er Jahre erstmals beschrieben und stammen von TEM-1 und TEM-2 ab (BRADFORD 2001). IRT werden nicht zu den ESBL gezählt, sondern in die funktionelle Gruppe 2dr (BUSH und JACOBY 2010). Nichtsdestotrotz wurden Mutanten gefunden, die fähig sind, Cephalosporine der 3. Generation zu hydrolysieren und eine reduzierte Anfälligkeit für β -Laktamase-Inhibitoren besitzen. Diese CMT (complex mutants of TEM) wurden bereits bei einigen *Enterobacteriaceae* nachgewiesen, darunter *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* und *Enterobacter aerogenes* (CANTÓN et al. 2008).

SHV-1 (sulfhydryl variable) wurde 1972 von PITTON entdeckt. Es stammt vermutlich von einer chromosomal vorliegenden Penicillinase eines *Klebsiella pneumoniae*-Isolats ab und wurde Plasmid-vermittelt auf weitere *Enterobacteriaceae* übertragen. Es ist für 20 % der Plasmid-vermittelten Resistenz bei *Klebsiella pneumoniae* gegenüber Ampicillin verantwortlich (TZOUVELEKIS und BONOMO 1999). SHV-2, der erste Vertreter der SHV mit erweitertem Wirkspektrum, konnte 1985 in einem Isolat von *Klebsiella ozaenae* nachgewiesen werden. Es ist in der Lage, Cefotaxim sehr effizient zu hydrolysieren, Ceftazidim dagegen nur in geringerem Maße (KLIEBE et al. 1985). SHV mit erweitertem Wirkspektrum unterscheiden sich meist in nur einer Aminosäure von ihrem Vorgänger. Sie sind weltweit präsent, ihr Vorkommen beschränkt sich aber zumeist auf *K. pneumoniae* und *E. coli* (LIAKOPOULOS et al. 2016). Im Gegensatz zu TEM wurde bei den SHV- β -Laktamasen bisher nur ein Inhibitor-resistenter Mutant SHV-10 in *E. coli* beschrieben (TZOUVELEKIS und BONOMO 1999).

In den letzten Jahren wurden die TEM- und SHV-ESBL weitestgehend von der Familie der CTX-M-Enzyme abgelöst (CANTÓN et al. 2012). CTX-M besitzen eine von TEM und SHV getrennte phylogenetische Entwicklung, da sie lediglich 39 % Homologie in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen (BARTHÉLÉMY et al. 1992). Als Vorläufer gelten chromosomale *bla*-Gene von *Kluyvera* spp., die auf mobile genetische Elemente übergegangen sind und sich in den letzten Jahren rasant unter der Familie der *Enterobacteriaceae* verbreitet haben (CANTÓN et al. 2012). 1989 wurden die ersten CTX-M-Enzyme zeitgleich in Deutschland und Südamerika entdeckt. BAUERNFEIND et al. beschrieb ein *E. coli*-Isolat eines an Otitis erkrankten Kindes in München, das resistent gegenüber Cefotaxim, allerdings sensibel gegenüber Ceftazidim war, und benannte es entsprechend seines Wirkspektrums und des Fundorts (CTX für Cefotaxim und M für München). In Südamerika wurden Enzyme mit dem gleichen hydrolytischen Profil aus *Salmonella typhimurium* isoliert (BAUERNFEIND et al. 1992). Dem vorausgehend wurde bereits 1986 ein Cefotaxim-resistentes *E. coli*-Isolat in der Intestinalflora japanischer Laborhunde entdeckt und FEC-1 genannt (MATSUMOTO et al. 1988). Heute ist es bekannt als CTX-M-3. In den 1990er Jahren werden immer mehr Vertreter der CTX-M-Familie beschrieben und es findet eine Divergenz der Enzyme in eine sehr heterogene Gruppe statt, die heute in 6 Cluster zusammengefasst wird: CTX-M1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 und KLUC. Die Vertreter der einzelnen Gruppen unterscheiden sich um bis zu 90 %, während sie innerhalb eines Clusters um maximal 5 % divergieren (D'ANDREA et al. 2013). CTX-M-Gene sind gewöhnlich auf Plasmiden mit einer Größe von 7 bis 160 kbp lokalisiert und häufig mit weiteren *bla*-Genen wie TEM-1, TEM-2, SHV und OXA-1 assoziiert. Außerdem können die Plasmide Resistenzgene für andere Antibiotikaklassen wie Aminoglykoside, Chloramphenicol, Sulfonamide, Trimethoprim und Tetracycline tragen (BONNET 2004). Diese Eigenschaft zur Koselektion mehrfach resistenter mdr-Plasmide trug vermutlich stark zur Zunahme der CTX-M-ESBL bei (POIREL et al. 2018).

OXA- β -Laktamasen sind in der Lage Oxacillin und Cloxacillin zu hydrolysieren und lassen sich nur in geringem Maße durch Clavulansäure hemmen. Sie gehören zur Ambler-Klasse D und der funktionellen Gruppe 2d (BUSH et al. 1995). Die Gruppe der OXA- β -Laktamasen wurde eher aufgrund ihrer phänotypischen als der genotypischen Ähnlichkeit gegründet, um Enzyme mit diesem speziellen hydrolytischen Profil zusammenfassen zu können. Manche Mitglieder weisen lediglich 20 % Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf (BRADFORD 2001). Die Mehrheit der OXA-Enzyme ist allerdings nicht in der Lage Breitband-Cephalosporine zu inaktivieren und werden daher nicht zu den ESBL gezählt. Die meisten OXA-ESBL

stammen von OXA-10 ab, das schwache hydrolytische Aktivität gegenüber Cefotaxim, Ceftriaxon und Aztreonam aufweist (PATERSON und BONOMO 2005). 1991 wurde in einem Krankenhaus in Ankara ein resistentes Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen, das Mutationen an zwei Stellen seiner Aminosäuresequenz gegenüber OXA-10 aufwies und Ceftazidim mit hoher Affinität hydrolysieren konnte (HALL et al. 1993). Das Vorkommen von OXA-ESBL beschränkt sich hauptsächlich auf *Pseudomonas aeruginosa*. Eine Übertragung auf andere Bakterienspezies fand bisher kaum statt, sodass ihre klinische Rolle eher von untergeordneter Natur zu sein scheint (EVANS und AMYES 2014).

Seltener treten auch weitere ESBL auf, die nicht mit den oben genannten Gruppen verwandt sind. Sie sind alle Plasmid-mediiert oder Integron-assoziiert und lassen sich der Ambler-Klasse A zuordnen.

PER-1 hydrolysiert Penicilline und Cephalosporine und ist durch Clavulansäure hemmbar. Es wurde zuerst in *Pseudomonas aeruginosa* entdeckt (NORDMANN et al. 1993) und später auch in *Salmonella* Typhimurium und *Acinetobacter* spp. nachgewiesen (VAHABOGLU et al. 1995, VAHABOGLU et al. 1997). PER-2 weist 86 % Homologie zu PER-1 auf und wurde in *Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* und *Vibrio cholerae* detektiert (BAUERNFEIND et al. 1996). Interessanterweise beschränkt sich das Vorkommen von PER-1 bisher vor allem auf die Türkei, während PER-2 fast ausschließlich in Südamerika nachgewiesen wurde (BRADFORD 2001).

VEB-1 wurde erstmals in einem *E.coli*-Isolat eines vietnamesischen Patienten in Frankreich beschrieben (POIREL et al. 1999), während CME-1 aus *Chryseobacterium meningosepticum* isoliert wurde (ROSSOLINI et al. 1999) und TLA-1 in einem *E. coli*-Isolat eines mexikanischen Patienten nachgewiesen werden konnte (SILVA et al. 2000).

PER-1 und -2, VEB-1, CME-1 und TLA-1 weisen eine Verwandtschaft von 40 bis 50 % auf und sind in der Lage, Oxyiminocephalosporine, vor allem Ceftazidim und Aztreonam, zu inaktivieren (BRADFORD 2001).

2.4 Vorkommen und Verteilung von ESBL bei Nutztieren und ihr zoonotisches Potenzial

Der erste Nachweis von ESBL-produzierenden Bakterien beim Tier erfolgte bereits 1988 in Japan (MATSUMOTO et al. 1988), doch erst in den letzten 20 Jahren nahm das

wissenschaftliche Interesse an diesem Thema stetig zu. Heute existieren diverse Studien zur Prävalenz von ESBL bei Menschen und Tieren, sowie in Lebensmitteln und der Umwelt.

Das Vorkommen ESBL-produzierender Bakterien ist in Mastgeflügelbeständen im Vergleich zu rinder- und schweinehaltenden Betrieben am höchsten und reicht in europäischen Studien von 25 % bis 100 % (HILLE et al. 2014). Die Prävalenzen in Schweinemastbeständen variieren sehr stark zwischen 3 % in einer Schweizer Studie (ENDIMIANI et al. 2012) und 80 % in Spanien (BLANC et al. 2006).

In der Rinderhaltung herrschen zum Teil sehr große regionale Unterschiede in den Betriebsstrukturen und der Betriebsführung. Außerdem ist insbesondere das Leben einer Milchkuh je nach Altersstufe und Lebenszyklus geprägt von zum Teil stark unterschiedlichen Haltungsformen und eingesetzten Antibiotikamengen (HILLE et al. 2014). Einzelne Prävalenzstudien für diese Tierart sollten daher differenziert betrachtet werden.

Mastrinder tragen weniger häufig ESBL-E als Milchrinder (REIST et al. 2013, SCHMID et al. 2013). Neben der Produktionsrichtung variieren die auch die Prävalenzen in den Altersgruppen stark. WATSON et al. konnten in einer Langzeitstudie nachweisen, dass bis zu 98 % der neugeborenen Kälber bis zum 21. Lebensstag Träger von ESBL-E sind. In den darauffolgenden 100 Tagen reduzierten sich die Nachweisraten bis auf 10 %. Weiterhin stellten sie fest, dass Kühe nach der Geburt achtmal häufiger ESBL-E ausscheiden als im Zeitraum davor und das Vorkommen bei laktierenden Kühen höher ist als bei Trockenstehern (29,4 % bei Hochleistern gegenüber 3,4 % bei Trockenstehern).

Die Gene *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-12} und *bla*_{TEM-52} treten am häufigsten bei Mensch und Tier auf. Allerdings gibt es Unterschiede in der Dominanz der einzelnen Subtypen je nach Reservoir. Während in der menschlichen Bevölkerung und in Krankenhäusern CTX-M-15 die vorherrschende Variante ist, tragen Legehennen und Masthähnchen hauptsächlich SHV-12. Bei Rindern und Schweinen kommt dagegen CTX-M-1 am häufigsten vor. Somit besteht zwar ein gewisses zoonotisches Potenzial, die Übertragung von ESBL-E von lebensmittelliefernden Tieren auf den Menschen, beispielsweise über Fleisch oder Abwasser, spielt aber längst keine so große Rolle, wie vielleicht anzunehmen ist.

Eine Ausnahme bilden Personen, die in direktem Kontakt mit Nutztieren stehen, wie Landwirte, Betriebspersonal und Tierärzte. Sie trugen vornehmlich Genvarianten, die in den jeweiligen Tierpopulationen vorherrschten. Dies konnte hauptsächlich für den Geflügel- und den Schweinehaltungssektor nachgewiesen werden (DIERIKX et al. 2013, DOHMEN et al. 2015).

2.5 Nachweis und Identifikation von ESBL

2.5.1 Phänotypischer Nachweis

Ein phänotypischer Nachweis der ESBL-Produktion erfolgt über eine Empfindlichkeitsprüfung der Erreger. Sowohl das Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) als auch das European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) empfehlen ein Screening auf ESBL mittels Empfindlichkeitstestung der Leitsubstanzen aus der Gruppe der Oxyiminocephalosporine (Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftazidim, Cefpodoxim) gefolgt von einer phänotypischen Bestätigung durch die Kombination der Leitsubstanzen mit einem β -Laktamase-Inhibitor (Clavulansäure). Beide Institutionen nennen das Mikrodilutionsverfahren und den Agardiffusionstest als Methoden der Wahl (CLSI 2018, EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING 2017)

Beim Mikrodilutionsverfahren oder Reihenverdünnungstest werden Verdünnungsreihen der antibiotisch wirksamen Substanzen angelegt und mit einem definierten Inokulum des Erregers beimpft (SELBITZ et al. 2015). Nach entsprechender Bebrütung wird die erste Verdünnungsstufe abgelesen, auf der keine Trübung zu erkennen ist und somit kein Wachstum des getesteten Keims. Dieser Wert entspricht der Minimalen Hemmkonzentration (MHK). Die EUCAST-Empfehlungen nennen einen Breakpoint von >1 mg/l für ein positives Screening-Ergebnis und eine Reduktion des MHK um ≥ 3 Titerstufen des Cephalosporins in Kombination mit Clavulansäure verglichen mit dem alleinig eingesetzten Wirkstoff für die phänotypische Bestätigung (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING 2017).

Beim Agardiffusionstest diffundiert die Substanz ausgehend von einem antibiotikahaltigen Plättchen in den umgebenden Nährboden und lässt so einen Wirkstoffgradienten entstehen. Der vorher mit dem zu testenden Keim beimpften Agar wird bebrütet und es zeigt sich bei Empfindlichkeit des Erregers eine typische Wachstumshemmzone („Hemmhof“) um das Plättchen. Der Durchmesser des Hemmhofs kann anschließend mit einer Schablone abgelesen werden. EUCAST gibt Hemmhofdurchmesser für Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftazidim und Cefpodoxim für einen positiven Screening-Test an (siehe Tabelle 2). Der phänotypische Bestätigungstest ist positiv, wenn der Hemmhofdurchmesser ≥ 5 mm größer ist für die Kombination mit Clavulansäure im Vergleich zum einzelnen Wirkstoff (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING 2017).

Tabelle 2: Hemmhofdurchmesser für einen positiven Screening-Test mittels Agardiffusion (modifiziert nach EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING 2017)

Wirkstoff	Hemmhofdurchmesser
Cefotaxim (5 µg) oder Ceftriaxon (30 µg)	<21 mm
UND Ceftazidim (10 µg)	<23 mm
Cefpodoxim (10 µg)	<22 mm
	<21 mm

2.5.2 Genotypische Identifikation

Phänotypische Methoden zur Detektion von ESBL-bildenden Bakterien sind zwar kostengünstig und relativ einfach durchzuführen, sie benötigen allerdings meist 2 Tage und lassen eine gewisse Fehlerrate bei der Interpretation der Ergebnisse zu (GRIMM et al. 2004). Eine schnelle und genauere Alternative ist die Bestimmung der *bla*-Gene mittels molekularbiologischer Methoden wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Sequenzanalyse.

Als einfachstes und schnellstes Verfahren steht die PCR in Form von Single oder Multiplex Assays zur Verfügung. Multiplex Assays dienen vorrangig der Identifizierung der unterschiedlichen ESBL-Gruppen (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}), indem für jedes zu identifizierende Gen ein entsprechendes Primerpaar eingesetzt wird. Es ist allerdings darauf zu achten, dass die Primer hochspezifisch an ihre Zielsequenz binden, nicht miteinander reagieren, möglichst ähnliche Zyklusbedingungen verlangen und die PCR-Produkte unterschiedliche Größen aufweisen, um sie leicht differenzieren zu können (LUPO et al. 2013). Mit Single PCR Assays kann ein bestimmtes Gen oder eine Gen-Familie nachgewiesen werden. Mittlerweile stehen diverse Single wie auch Multiplex PCR-Assays zur Charakterisierung von ESBL-Gruppen und einzelner Genfamilien zur Verfügung.

Die Identifizierung einzelner Genvarianten bedarf der DNA-Sequenzierung. Mit dem Whole Genome Sequencing (WGS) kann eine genaue Aussage über das Vorhandensein von β -Laktamase-Genen und anderen Resistenzgenen getroffen werden. Durch eine stetige Reduktion in den Durchführungskosten wird das WGS in den nächsten Jahren weiter in den Fokus der Diagnostik rücken (AL-BAYSSARI et al. 2015).

3 Veröffentlichung

Multidrug-resistant enterobacteria in newborn dairy calves in Germany

Jil Waade, Uwe Seibt, Walther Honscha, Fanny Rachidi, Alexander Starke, Stephanie Speck, Uwe Truyen

PLoS ONE 16(3): e0248291

Eigenanteil

Die Autorin dieser Arbeit hat in folgenden Anteilen zur Publikation „Multidrug-resistant enterobacteria in newborn dairy calves in Germany“ beigetragen:

Das der Publikation zugrundeliegende Projekt „Erarbeitung von Handlungsempfehlungen zur Minimierung infektiöser Faktorenerkrankungen in der Rinderhaltung“ wurde im Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. vet. Uwe Truyen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. vet. Uwe Truyen und Frau Dr. med. vet. Stephanie Speck in Zusammenarbeit mit dem Sächsischen Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie.

Das Versuchsdesign wurde in Absprache mit Frau Dr. Speck festgelegt. Sämtliche Feldarbeit und Laborversuche wurden von der Autorin der Dissertation eigenständig geplant und mit der Unterstützung von Frau Dana Rüster, Frau Evelin Brumme sowie Herrn Mario Reinhardt durchgeführt. Es erfolgte eine regelmäßige Datenauswertung und Anpassung des Versuchsablaufes mit Frau Dr. Speck.

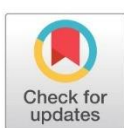
Die Literaturrecherche erfolgte durch die Autorin. Das Manuskript für die Publikation wurde unter Anleitung von Frau Dr. Speck und Herrn Prof. Truyen selbständig durch die Autorin verfasst und in Zusammenarbeit mit den Koautoren fertig gestellt. Es wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet.

RESEARCH ARTICLE

Multidrug-resistant enterobacteria in newborn dairy calves in Germany

Jil Waade¹, Uwe Seibt², Walther Honscha², Fanny Rachidi³, Alexander Starke³, Stephanie Speck¹, Uwe Truyen^{1*}

1 Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Leipzig University, Leipzig, Germany, **2** Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Leipzig University, Leipzig, Germany, **3** Faculty of Veterinary Medicine, Clinic for Ruminants and Swine, Leipzig University, Leipzig, Germany

* truyen@vetmed.uni-leipzig.de

Abstract

We studied the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in dairy calves as part of a routine health check protocol. In addition, data regarding antimicrobial use (AMU), farm hygiene, and farm management were collected in order to identify possible risks for ESBL occurrence. Ten farms participated in the study with a median of 781 milking cows (319–1701). All calves investigated were younger than two weeks with an average age of 6.8 (± 3.9) days. The farms were visited and samples were collected twice at an interval of 7–11 months. Faecal samples diluted 1:10, were plated onto *Brilliance*TM ESBL agar in duplicates. After 24 hours at 37°C, colonies were counted and total colony forming units (cfu)/ml calculated. Bacteria species were identified biochemically. ESBL-production was phenotypically confirmed using the MICRONAUT-S β -Lactamases system. Additionally, antimicrobial susceptibility was tested using VITEK[®] 2 technology. Phylotyping of *E. coli* isolates and screening for *bla* genes was performed by PCR. ESBL-producing enterobacteria were detected on all farms and 96.5% of calves investigated shed ESBL-positive bacteria. Of all ESBL-producing isolates, the majority were *E. coli* (92.9%), followed by *Enterobacter cloacae* (5.1%) and *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (2.0%). The majority of *E. coli* isolates was clearly assigned to phylogroup C (25.0%), followed by phylogroups A (15.2%) and E (14.1%). CTX-M group 1 was most frequently detected (80.4%). *E. cloacae* contained *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} or *bla*_{SHV}. *K. pneumoniae* harboured *bla*_{SHV} only. Besides resistance to penicillins and cephalosporins, the majority of isolates was also resistant to one or more antibiotic classes, with a high proportion being resistant against fluoroquinolones. 52.5% of isolates were further characterised as threefold multidrug resistant gram-negative bacteria (3MDR-GNB) according to the German Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention. None of the isolates were 4MDR-GNB, i.e. none revealed carbapenem-resistance. Penicillins were the most frequently administered antibiotics to calves on most farms and were the predominant substance class at herd level on all farms. Overall, the number of calves treated prior to sampling was rather low (11.7%). Analyses of data regarding the farm management identified weaknesses in biosecurity and cleaning and disinfection. Besides beta-lactam antibiotics being the most commonly used antibiotics no other risk factors could be identified. In summary, the prevalence

OPEN ACCESS

Citation: Waade J, Seibt U, Honscha W, Rachidi F, Starke A, Speck S, et al. (2021) Multidrug-resistant enterobacteria in newborn dairy calves in Germany. PLoS ONE 16(3): e0248291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248291>

Editor: Iddya Karunasagar, Nitte University, INDIA

Received: October 27, 2020

Accepted: February 23, 2021

Published: March 12, 2021

Copyright: © 2021 Waade et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

Funding: We acknowledge support from Leipzig University for Open Access Publishing. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

of ESBL-carriers in dairy calves was exceptionally high and should be motivation to develop strategies for the reduction of multidrug-resistant bacteria in farm animals.

Introduction

Antimicrobial resistance is of worldwide concern. The WHO even goes as far as warning about a post-antibiotic era in which infections that are common now, will become life-threatening again [1]. The occurrence of multidrug-resistant bacteria in the community and in hospitals as well as in animal husbandry has increased rapidly over the last decades [2]. Especially the rise of multidrug-resistant Gram negative bacteria (MDR-GNB), with enterobacteria such as *Klebsiella (K.) pneumoniae* and *Escherichia (E.) coli*, is of growing concern and has been subject to many studies worldwide [3–5]. In Germany, MDR-GNB are further differentiated as so-called 3MDR-GNB (resistant against three classes of antibiotics, i.e. acylureidopenicillins, 3rd and 4th generation cephalosporins and fluoroquinolones) or 4MDR-GNB (resistant against four classes of antibiotics, i.e. carbapenems additionally to the aforementioned) [6]. In both, extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) play an important role. ESBL are able to hydrolyse penicillins and cephalosporins including 3rd and 4th generation cephalosporins [7]. The latter are categorized by the WHO as critically important antimicrobials [8] as well as by the European Medical Association (EMA) as Category B ('Restrict') [9]. Resistance in ESBL-producing enterobacteria is predominantly determined by the plasmid-mediated beta-lactamase genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* and *bla_{CTX-M}*. In the 1990s and early 2000s, beta-lactamases of the TEM and SHV families dominated, whereas balance shifted towards the newly discovered family of CTX-M enzymes. Today, they are the most prevalent enzyme family with CTX-M-15 and CTX-M-1 most commonly isolated in humans and food animals [5]. The occurrence of ESBL-producing bacteria has been described to be highest in poultry, followed by cattle and pigs [10]. Prevalence in cattle vary greatly depending on age, production type and lactation stage. Watson et al. [11] reported a high proportion of newborn calves being positive for ESBL-producing *E. coli* (ESBLE). Incidence then declined from 97% at day 21 to less than 10% at day 161. Beef cattle are less likely to carry ESBLE compared to dairy cattle [11–13]. Shedding of ESBLE in cows is most prominent post-partum and during lactation [11]. Risk factors for the prevalence of ESBL-producing bacteria are believed to be feeding of waste milk that contains residues of antimicrobial substances [14, 15] and the use of 3rd and 4th generation cephalosporins. Management factors, such as an open herd policy and/or poor hygiene management, such as infrequent cleaning of feeding buckets, have also been identified as risk factors [16]. Although the data basis is steadily expanding, there is still a lack of information on the prevalence of ESBL in German dairy cattle [13, 17, 18], especially for the unique farm structure in the eastern part of Germany, where large herds are kept on few farms [19].

As part of a cooperation project entitled "Development of guidelines for the prevention of factorial diseases in cattle husbandry" we investigated the prevalence of MDR enterobacteria in dairy calves on ten farms. Data regarding antimicrobial use (AMU), farm hygiene, and management factors were collected and a possible link between farm hygiene, AMU, and MDR enterobacteria was examined.

Materials and methods

Study population

Ten dairy farms in Saxony, all within a radius of 100 km around the city of Chemnitz, volunteered to participate in the study and confirmed by written consent. All farms have been visited

regularly by the Clinic for Ruminants and Swine in the preceding years as part of an integrated veterinary herd health care service or other scientific projects. The farms kept a median of 781 (319–1701) milking cows and a median of 36 (18–86) calves that were younger than two weeks. Calves were generally housed in individual pens or hutches for the first two weeks, either indoors (five farms) or outdoors (five farms). Calves on three farms were moved to group pens after 4–7 days. Waste milk was fed to the calves on seven of the ten farms. On one farm the milk was fed to all calves, on the remaining six farms only to bull calves. There was no data available on the proportion of waste milk containing antibiotic residues.

Data collection and animal sampling

The farms were visited twice with an interval of 7–11 months from April 2018 to November 2019. During these visits an interview with the herd manager and an on-site inspection of the farm was carried out. The hygienic status of the farms was recorded and rated using a standardized questionnaire developed for dairy cattle [20]. The questions could either be answered with 'no' or 'yes' (translating to 0 or 3 scoring points) or in the fashion of 'not fulfilled', 'partially fulfilled' or 'fulfilled' (translating to 0, 1 or 3 scoring points). Weighted average ratios (in the following simply referred to as ratios) were calculated to describe the overall hygienic status on the farms as well as different aspects of dairy husbandry, such as biosecurity, feed and water hygiene, birth management and housing of cows and calves. Using scores between 0.00 to 3.00, the hygienic status of the farms was classified as poor (ratio 0.00–1.49, indicated by the colour red), medium (1.50–2.39, yellow) or good (2.40–3.00, green). Data on animal health and antimicrobial treatment were collected through animal scoring and the herd management program. The obtained information on AMU was collected in a database especially designed for this study and was further evaluated regarding gross amounts of used substances on herd level as well as for the different age groups.

On each farm, at each sampling day, faecal samples of 10 randomly selected calves, aged 0–14 days, were collected at each sampling day manually from the rectum or, if observed and clearly assignable to the individual, picked up from the ground. This adds up to a total of 200 samples. The samples were collected during routine health check-ups and transported at 4°C to the laboratory for further investigation. The presence of bovine coronavirus, bovine rotavirus, *Cryptosporidium parvum*, and *E. coli* K99 (F5) were examined using Speed V-Diar 4™ (Virbac BVT, Bad Oldesloe, Germany) according to the manufacturer's instructions. These results will be reported elsewhere. The ID number, age and gender of each calf were documented. The study was approved by the Animal Welfare Officer of the Veterinary Faculty at Leipzig University.

Microbiological methods

All faecal samples were processed on the same day as collection. One gram of the sample was suspended in 9 ml NaCl-Tryptone broth (NaCl-T; pH 7.0; 1.0 g tryptone, 8.5 g NaCl ad 1000 ml *Aqua dest.*) and homogenized using a Laboratory Blender Stomacher 400 (Seward Limited, West Sussex, UK) for 60 sec. Homogenates were serially diluted 1:10 in NaCl-T. 100 µl of each suspension was plated in duplicates onto *Brilliance*™ ESBL agar (Oxoid Deutschland GmbH/Thermo Scientific, Wesel, Germany) and incubated under aerobic conditions for 24 hours at 37°C. A pre-enrichment step was not performed. The colonies were counted and total colony forming units (cfu)/ml calculated. All morphologically different colonies from the samples of each farm were isolated and sub-cultured onto Columbia sheep blood agar (7% sheep blood; Oxoid Deutschland GmbH/Thermo Scientific) and Gassner agar (Sifin Diagnostics GmbH, Berlin, Germany). The bacterial species was identified biochemically using the RapID™ ONE

System (Thermo Scientific, Wesel, Germany). If test results were inconclusive, isolates were sent to an external laboratory (Diagnosticum, Neukirchen, Germany) for species identification using MALDI TOF. All faecal samples and isolates were stored at -80°C after processing.

Further characterisation as described in the following, was performed on the first 100 isolates that were obtained.

Susceptibility testing

ESBL-production was phenotypically confirmed using the commercially available MICRO-NAUT-S β -Lactamases system (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Germany) according to the manufacturer's instructions. Additionally, the isolates were sent to the Saxon State Laboratory for further testing of antimicrobial susceptibility using VITEK[®] 2 technology (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France). The following substances were tested: ampicillin, ampicillin-sulbactam, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin-tazobactam, cefuroxime, cefotiam, cefpodoxime, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, imipenem, meropenem, gentamicin, ciprofloxacin, levofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and nitrofurantoin. Results were interpreted using clinical breakpoints for *Enterobacterales* defined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [21]. Furthermore, all isolates were classified as 3MDR-GNB or 4MDR-GNB according to the German Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention [6, 22].

Determination of *bla*-genes

Isolates that proved to be phenotypically positive for ESBL-production were screened for the presence of *bla*_{CTX-M} groups 1 and 9, *bla*_{TEM}, and *bla*_{SHV} using PCRs as described by Gröbner et al. [23] and Strauß et al. [24]. The primer sequences are listed in S1 Table. Prior to PCR, one to three colonies of each isolate were suspended in 200 μ l phosphate-buffered saline (pH 7.2) and heated at 99°C for 10 minutes. The lysates were gently centrifuged and diluted 1:10 before being used for PCR. *E. coli* isolates 314/11 (CTX-M-2, phylogroup B1), 277/11 (TEM-52, phylogroup D), *Klebsiella pneumoniae* isolate 175/13 (SHV-1, CTX-M-15) and *Enterobacter cloacae* isolate 666/18 (CTX-M-9) were used as positive controls and were kindly provided by Yvonne Pfeifer, Robert Koch-Institute, Wernigerode, Germany.

Phylotyping of *E. coli* isolates

Phylogroups were assigned using the quadruplex-PCR as described by Clermont et al. [25] which is able to detect strains belonging to group A, B1, B2, C, D, E, F, and clade I. Phylogroup assignment was carried out by scoring the presence or absence of the genes *arpA*, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*, and *trpA*. The primers used are described in S1 Table. The *E. coli* strains described above were also used as a control in the phylo-typing PCR. In addition, the following *E. coli* strains were used: 305/11 (phylogroup A), RL 45 (phylogroup C) and RL 72 (phylogroup E). The latter two were kindly provided by Dr. Jens Hammerl, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin.

Results and discussion

The objectives of this project were to study the prevalence of ESBL-producing enterobacteria in newborn calves on dairy farms, and to identify possible risk factors contributing to a high occurrence of ESBL-carriers. ESBL-producing enterobacteria were detected on all ten farms examined in the study. Of 200 faecal samples, 193 contained ESBL-producing enterobacteria which corresponded to a 96.5% prevalence of animals. This is much higher than reported in

other studies performed in Germany, Switzerland, and Israel, which found an overall prevalence of 8.4%–56.2% and up to 26.2% in diseased calves [12, 13, 18, 26–28]. Major differences may relate to farm structures and farm practices, age of animals, and sampling on farms or at the slaughterhouse [12, 13, 28]. However, a similar amount (97.8%) of calves shedding ESBL-producers was found in the UK [13]. The highest prevalence of ESBL-E is usually found in young animals, notably suckling calves, which corresponds to our findings, but with increasing age ESBL-E prevalence gradually decreases [12, 13, 28, 29]. The average age of sampled calves in this study was 6.8 (± 3.9) days. In our study animals older than 14 days were not sampled.

The average amount of ESBL-producing bacteria per g faeces was 1.7×10^9 ($\pm 6.7 \times 10^9$) cfu/g faeces which is more than reported elsewhere [30]. It is noteworthy that a valid comparison of different studies is difficult due to different study designs, sampling techniques, and screening protocols. Although we decided against a pre-enrichment step, the prevalence determined in our study was much higher compared to others that used a pre-enrichment step [13, 26, 27].

A total of 100 ESBL-producing isolates was further characterized. These included all 87 isolates from the first round of sampling as well as 13 isolates that were found on the first 3 farms during the second round of sampling. The majority were *E. coli* (92/100; 92.0%), followed by *Enterobacter (E.) cloacae* (5/100; 5.0%) and *Klebsiella (K.) pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (2/100; 2.0%). One isolate was an AmpC-producing *Morganella morganae* and thus excluded from the study. This distribution is in accordance to two studies from Switzerland which reported *E. coli* being the predominant ESBL-producing species in faeces from cattle, whereas ESBL-producing *E. cloacae* were found to a much lesser extent [12, 26]. The occurrence of ESBL-producing *K. pneumoniae* in cattle faeces has only recently been described [31]. Of all faecal samples investigated, three contained more than one of the above mentioned ESBL-producing species. The majority of *E. coli* isolates was clearly assigned to phylogroup C (23/92; 25.0%), followed by phylogroups A (14/92; 15.2%) and E (13/92; 14.1%). Phylogroups B1, D, and F were found less frequently with ten (10.9%), eight (8.7%) and six (6.5%) isolates, respectively. None of the isolates belonged to phylogroup B2. For 18 out of 92 (19.6%) *E. coli* the unambiguous assignment to either phylogroup A or C was not possible using the PCRs of Clermont et al. [25]. These isolates are therefore referred to as members of phylogroup A/C. Overall, isolates belonging to phylogroups C, A/C, and A were predominant. This distribution is in contrast to other studies where phylogroups A and B1 were dominantly found in ESBL isolates from healthy animals [18, 32–36]. The main reason for the differences compared to other studies might be that the PCR-protocols used elsewhere may not discriminate between phylogroups A and C [18, 33, 35, 36]. However, differences in phylogroup distribution might also be attributed to geographic location, climate, feeding habits or other factors [37].

We screened 99 ESBL-producing isolates for the presence of *bla* genes. Detailed results can be obtained from Table 1. The majority of *E. coli* isolates (75/92, 81.5%) harboured *bla*_{CTX-M} genes, with CTX-M group 1 predominating (80.4%). This is consistent with other German and European studies in which most frequently CTX-M group 1 followed by CTX-M group 9 were detected [13, 18, 27, 35, 38]. CTX-M group 9 was detected in five *E. coli* either as the only *bla* gene ($n = 1$) or in combination with other *bla* genes ($n = 4$). Only one isolate did not belong to either group 1 or 9. In 45 *E. coli* (48.9%), *bla*_{CTX-M} was found in combination with *bla*_{TEM}. Overall, the prevalence of *bla*_{TEM} (61.9%) in *E. coli* either in combination with *bla*_{CTX-M} or alone was higher compared to other studies [33, 39]. Four *E. coli* (4.3%) were negative for CTX-M, TEM, and SHV. Of the ESBL-producing *E. cloacae* and *K. pneumoniae*, one *E. cloacae* contained *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} whereas the remaining four and the two *K. pneumoniae* harboured *bla*_{SHV}. Studies on ESBL-producing enterobacteria other than *E. coli* in animals are scarce. In contrast to our findings, *bla*_{SHV} was the dominant gene in *E. coli* compared to *K. pneumoniae* in a recent South African study [31]. To the authors best knowledge there is only

Table 1. Distribution of *bla* genes.

	total (n = 99)	Number of isolates (%)		
		<i>E. coli</i> (n = 92)	<i>E. cloacae</i> (n = 5)	<i>K. pneumoniae</i> (n = 2)
CTX-M-1 group + TEM	43 (43.4)	42 (45.7)	1 (20.0)	0 (0.0)
CTX-M-1 group	28 (28.3)	28 (30.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
TEM	12 (12.1)	12 (13.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
CTX-M-1 group + CTX-M-9 group + TEM	3 (3.0)	3 (3.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
CTX-M-9 group	1 (1.0)	1 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
CTX-M-1 group + CTX-M-9 group	1 (1.0)	1 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
Other CTX-M group	1 (1.0)	1 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
SHV	6 (6.1)	0 (0.0)	4 (80.0)	2 (100.0)
Not determinable	4 (4.0)	4 (4.3)	0 (0.0)	0 (0.0)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248291.t001>

one report on *E. cloacae* carrying *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} isolated from a sheep lamb in Switzerland [27].

We further characterised ESBL-producing bacteria for multidrug-resistance (i.e. as 3MDR-GNB or 4MDR-GNB). The definition given by the German Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention [6] is part of a national guideline which is used to guide infection prevention and control measures in human clinical settings [40]. Acknowledging the One Health concept and the risk of bacterial transmission between animals and humans in either direction, data on the occurrence of these MDR bacteria are of high importance for public health and animal health risk assessment. Besides resistance to penicillins and cephalosporins, 60 ESBL-producing isolates (60.6%) were additionally resistant to one or more antibiotic classes as determined by VITEK[®] 2 (Table 2, S2 Table) which is in accordance to other studies in cattle [13, 27, 35, 41] and other food animals [27, 35, 42]. Concordant to Schmid et al. [13] and Eisenberger et al. [43], a high proportion of isolates (46.5%) was also resistant to fluoroquinolones. Most probably quinolone resistance is plasmid-mediated by genes co-located to *bla*_{CTX-M} genes. However, even without plasmid-encoded insensitivity a strong association

Table 2. Species distribution and antimicrobial resistance profile of the 99 ESBL-producing isolates.

Resistance against	total n (%)	Number of isolates (%)		
		<i>E. coli</i> (n = 92)	<i>E. cloacae</i> (n = 5)	<i>K. pneumoniae</i> (n = 2)
Ampicillin, amoxicillin	99 (100.0)	92 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)
Ampicillin-sulbactam, amoxicillin-clavulanic acid	88 (88.9)	85 (92.4)	1 (20.0)	2 (100.0)
Piperacillin-tazobactam	4 (4.0)	4 (4.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
Cefuroxime, cefotiam	99 (100.0)	92 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)
Cefpodoxime proxetil	99 (100.0)	92 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)
Cefotaxime, ceftriaxone	99 (100.0)	92 (100.0)	5 (100.0)	2 (100.0)
Ceftazidime	16 (16.2)	12 (13.0)	4 (80.0)	0 (0.0)
Imipenem	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Meropenem	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Gentamicin	25 (25.3)	22 (23.9)	1 (20.0)	2 (100.0)
Ciprofloxacin	46 (46.5)	43 (46.7)	1 (20.0)	2 (100.0)
Levofloxacin	43 (43.4)	43 (46.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	45 (45.5)	42 (45.7)	1 (20.0)	2 (100.0)
Nitrofurantoin	1 (1.1)	1 (1.1)	N/A	N/A

N/A—not applicable.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248291.t002>

Table 3. Antibiotic treatment of calves investigated and corresponding therapeutic indications.

Antibiotic substance	Indication				Total treatments
	Pneumonia	Enteritis	Omphalitis	Fever	
Amoxicillin	4	1	5	0	10
Marbofloxacin	3	1	0	1	5
Benzylpenicillin	0	0	3	0	3
Colistin	0	1	1	0	2
Tulathromycin	2	0	0	0	2
Sulfadoxine/trimethoprim	0	0	2	0	2
Florfenicol	1	0	0	0	1
Total treatments	10	3	11	1	25

A total of 21 animals was treated. Four calves were treated twice. The numbers given in the table indicate the number of treatments independent of the duration of therapy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248291.t003>

between quinolone resistance and ESBL-production has been described [44, 45]. Fiftytwo isolates (52.5%) were further classified as 3MDR-GNB. This finding was similar to results from ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from humans [46]. None of the isolates proved to be 4MDR-GNB, i.e. all were susceptible to imipenem and meropenem (Table 2) which is contrary to a study from the UK that reported an unstable imipenem-resistant phenotype in 1.2% of their *E. coli* isolates [41]. In Europe, screening for carbapenem-resistance in livestock is still underrepresented and prevalence in European countries was reported as <1% [47]. In Germany, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* were mainly associated with swine and chicken whereas only a single report on ertapenem-resistance in *E. coli* from a beef cattle farm is published [13, 47].

The gross amounts (in g) of antimicrobial substances administered on farm level are shown in S3 Table. In contrast to other European countries such as Denmark or The Netherlands, reporting of AMU in dairy calves is not mandatory in Germany according to current jurisdiction [48]. Therefore, the results presented here highly depended on the quality of documentation at farm level. Unfortunately, data regarding the use of antibiotics on one farm could not be evaluated due to inadequate documentation. Of 180 calves on the other farms, for which information on treatment was available, 21 (11.7%) received antibiotic treatment prior to sampling, four of which were treated twice. On two farms none of the sampled calves were treated before. Substances administered to calves and their corresponding indications are given in Table 3. There was no correlation between the treatment of a calf with antibiotics and their status as ESBL-carrier ($P = 0.7765$).

Of all thirteen antibiotic substance classes documented, 8–11 were used on herd level on all farms, whereas for calves the use was less diverse (2–9 substance classes). Penicillins were most frequently used in calves on all but two farms (Farm 2 and 6), which mainly administered amphenicols (Fig 1). On herd level, penicillins were the predominant substance class on all farms. Similar results were reported for dairy herds in the UK [49] and cattle in Germany [50]. However, van Rennings et al. [50] did not differentiate between production type or age group. Fluoroquinolones were used on six farms which might account for the high amount of resistant isolates in our study. Cephalosporins were not administered to calves on any of the farms. A comparison of AMU among the participating farms regarding gross amounts of antibiotic substance was not possible because a reliable treatment index could not be calculated from the animal numbers obtainable through the herd management program.

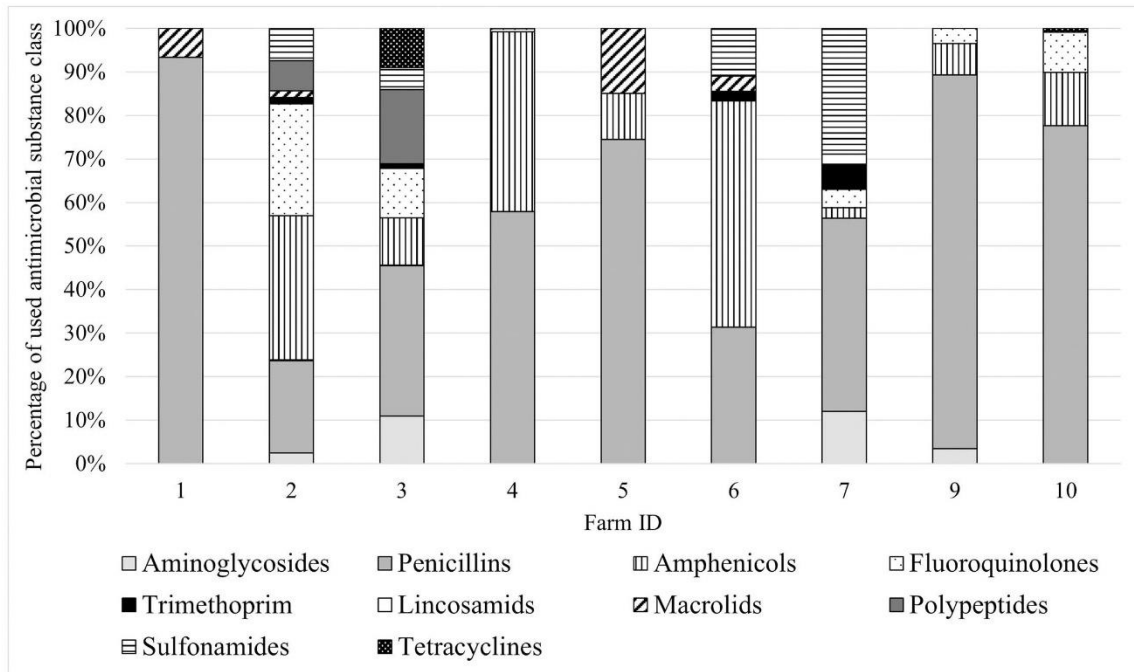


Fig 1. Proportional use of antibiotic substance classes on the 9 farms in newborn calves. Gross amounts in g were used as data basis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248291.g001>

The feeding of waste milk to the sampled calves had no statistically significant effect on their status as ESBL-carrier ($P = 0.1787$).

The scores obtained from hygiene analyses during both visits at each farm are shown in Table 4. Scores for overall hygiene ranged between 1.90 and 2.64. On average, the highest scores were achieved for the subsections 'barn climate' and 'milking' whereas the subsections 'biosecurity' and 'cleaning and disinfection' were assessed poorest. Because of the nearly 100% prevalence of ESBL no correlation to any possible risk factor could be evaluated.

In other studies, several factors contributing to a higher occurrence of ESBL have been identified: e.g. cleanliness of calf housings and calving pens, crowdedness, not applying teat sealants in cows at dry off, parental treatment of clinical mastitis, feeding milk replacer to calves, or the use of third- and fourth-generation cephalosporins [15, 28, 35, 51, 52]. The latter, however, is discussed controversially [52]. Moreover, pig farms located within a small radius of the cattle barn have been associated with higher odds of ESBL occurrence which might be attributed to airborne dust-bound ESBL [52, 53].

One of the aims of this study was to elucidate possible links between farm hygiene, AMU, and MDR enterobacteria. In our study, we determined a 100% ESBL prevalence at farm level. On all farms beta-lactams were the most commonly used antibiotics, but because of the 100% prevalence of ESBL at farm level no correlation to any possible risk factor could be evaluated.

The small sample number and the restriction to calves younger than two weeks can be seen as limitations of the study. Due to the fact that only the first 100 isolates obtained across the

Table 4. Results of the hygiene analyses for the 10 farms during both farm visits.

	Farm ID (no. of visits)																			
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Overall scoring	2.28	2.31	2.15	2.16	2.30	2.25	2.28	2.31	2.15	2.14	1.91	1.90	2.64	2.42	2.25	2.24	2.38	2.38	2.24	2.26
Biosecurity	1.62	1.62	1.84	1.84	1.79	1.83	1.94	1.94	1.52	1.52	0.84	0.84	2.20	2.20	2.00	2.00	1.66	1.66	1.60	1.60
Cleaning and disinfection	1.84	1.84	2.05	2.05	2.01	2.01	2.04	2.08	1.96	1.96	1.64	1.62	2.27	2.27	2.19	2.19	1.74	1.74	1.95	1.95
Feeding and water	2.10	1.96	1.69	1.85	1.84	1.84	1.82	1.98	2.01	1.97	1.59	1.59	2.19	2.32	2.21	2.21	2.51	2.42	2.08	2.08
Carcasses, waste products, disinfestation	2.16	2.16	1.58	1.67	2.32	2.32	2.34	2.42	2.01	1.79	1.72	1.72	2.21	2.32	1.98	1.98	2.49	2.49	2.14	2.14
Animal housing	2.38	2.34	2.21	2.24	1.96	1.93	1.77	1.83	2.21	2.25	1.66	1.66	2.38	2.32	1.99	1.94	2.39	2.39	2.06	2.06
Barn climate	2.73	2.83	2.51	2.47	2.47	2.35	2.73	2.77	2.74	2.79	2.63	2.43	2.96	2.73	2.96	2.96	2.64	2.64	2.57	2.87
Animal transport	2.56	2.56	2.06	2.06	2.88	2.88	2.69	2.69	2.63	2.63	1.81	1.81	2.13	2.13	2.81	2.81	2.81	2.81	2.31	2.31
Quarantine and sick pens	2.13	2.13	2.07	2.07	2.67	2.67	2.47	2.47	2.13	2.13	2.07	2.07	2.67	2.67	2.07	2.07	2.47	2.47	1.93	1.93
Insemination and birthing	2.18	2.48	2.23	2.23	2.30	2.30	2.35	2.32	2.04	2.04	2.12	2.12	2.47	2.29	1.71	1.71	2.30	2.30	2.57	2.57
Milking	2.55	2.55	2.43	2.43	2.45	2.45	2.54	2.54	2.50	2.50	2.20	2.20	2.79	2.79	2.48	2.48	2.73	2.73	2.42	2.42
Farm management	2.60	2.60	2.35	2.35	2.75	2.75	2.55	2.55	1.98	1.98	2.35	2.35	2.55	2.55	2.60	2.60	2.60	2.60	2.60	2.60

Ratios <1.50 indicate poor hygiene (highlighted in red); ratios 1.50–2.39 indicate medium hygiene (highlighted in yellow); ratios ≥2.40 indicate good hygiene (highlighted in green).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248291.t004>

project were further analysed, which represented all ten farms only in the first sampling, whereas in the second sampling only farms 1–3 were included, an overrepresentation of these farms cannot be excluded. The occurrence of ESBL-producing enterobacteria is most likely a multifactorial process. Hence, a longitudinal study including AMU and other relevant management factors, health and ESBL status of cows and calves is required to identify risk factors contributing to a high prevalence of ESBL in dairy herds. The high percentage of ESBL-carriage in calves reported here, highlights the overall need to develop strategies for the reduction of multidrug-resistant enterobacteria in newborn calves.

Conclusions

Our study revealed a 100% prevalence of ESBL-producing enterobacteria in calves at farm level and a prevalence of 96.5% at the individual level. Beta-lactam antibiotics were the most frequently used antimicrobials on the participating farms. This may have contributed to the persistence of ESBL at farm level and possibly to a co-selection of resistance against other antimicrobial substances. Although ESBL-prevalence has been described to decrease with increasing age of cattle, the high prevalence as well as the high number of ESBL-producing bacteria that are shed, require strategies to prevent the entry of ESBL into the calf rearing system at an early stage such as prudent use of antimicrobials during drying off and diligent hygiene in calving pens and calf housing. Further investigation is needed, to define the entry point(s) of ESBL into calf rearing.

Supporting information

S1 Table. Primer sequences and sizes of PCR products used for the determination of *bla*-genes and the extended quadruplex phylo-typing method. (DOCX)

S2 Table. Minimum inhibitory concentrations (mg/L) determined by VITEK[®] 2 technology for 99 ESBL-producing isolates.

(DOCX)

S3 Table. Gross amounts of antibiotic substance classes (in g) used on the farms in total and in newborn calves.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank the participating farmers for their cooperation in the research project. We would like to acknowledge Dr. Thilo Hackel at the Saxon State Laboratory for susceptibility testing of the isolates. We thank Mario Reinhardt and the technical staff at the Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health for their support in field work and laboratory testing.

Author Contributions

Conceptualization: Jil Waade, Uwe Seibt, Walther Honscha, Alexander Starke, Stephanie Speck, Uwe Truyen.

Data curation: Fanny Rachidi.

Funding acquisition: Uwe Truyen.

Investigation: Jil Waade, Fanny Rachidi, Stephanie Speck.

Methodology: Jil Waade, Alexander Starke, Stephanie Speck.

Project administration: Uwe Truyen.

Software: Uwe Seibt, Walther Honscha, Alexander Starke.

Supervision: Walther Honscha, Stephanie Speck.

Validation: Uwe Seibt, Walther Honscha, Fanny Rachidi, Stephanie Speck.

Visualization: Fanny Rachidi.

Writing – original draft: Jil Waade, Uwe Seibt, Fanny Rachidi, Stephanie Speck.

Writing – review & editing: Walther Honscha, Alexander Starke, Stephanie Speck, Uwe Truyen.

References

1. WHO. 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. World Health Organization, Geneva, 232 pp
2. Levy SB. Microbial resistance to antibiotics: an evolving and persistent problem. *Lancet*. 1982; 320 (8289), 83–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)91701-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)91701-9)
3. Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin. Microb. Infect.* 2008; 14, 117–123. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01851.x> PMID: 18154535
4. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill.* 2008; 13 (47), 19044. <https://doi.org/10.2807/ese.13.47.19044-en> PMID: 19021958
5. Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos AP, Mevius D et al. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 56 (7), 1030–1037. <https://doi.org/10.1093/cid/cis1043> PMID: 23243183

6. Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention (KRINKO) at the Robert Koch Institute (RKI). [Hygiene measures for infection or colonization with multidrug-resistant gram-negative bacilli. Commission recommendation for hospital hygiene and infection prevention (KRINKO) at the Robert Koch Institute (RKI)]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2012; 55:1311–54, Erratum in: Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2013;56:1342
7. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob. Agents and Chemotherapy. 2004; 48 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1>
8. WHO. Critically important antimicrobials for human medicine— 5th rev., World Health Organisation, Geneva. 2017; 48 pp
9. EMA/CVMP/CHM. Categorisation of antibiotics in the European Union. 2019 [cited 30 August 2020]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf
10. Hille K, Fischer J, Falgenhauer L, Sharp H, Brenner GM, Kadlec K et al. [On the occurrence of Extended-spectrum- and AmpC-beta- lactamase-producing *Escherichia coli* in livestock: results of selected European studies]. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 2014; 127 (9/10), 403–411. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-127-403> PMID: 25868168
11. Watson E, Jeckel S, Snow L, Stubbs R, Teale C, Wearing H et al. Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase *E. coli* (CTX-M-15) on a commercial dairy farm. Vet. Microbiol. 2012; 154 (3–4), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.020> PMID: 21840142
12. Reist M, Geser N, Hächler H, Schärer S, Stephan R. ESBL-producing *Enterobacteriaceae*: occurrence, risk factors for fecal carriage and strain traits in the Swiss slaughter cattle population younger than 2 years sampled at abattoir level. PLoS one. 2013; 8 (8), e71725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071725> PMID: 23977126
13. Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. Appl. Environ. Microbiol. 2013; 79 (9), 3027–3032. <https://doi.org/10.1128/AEM.00204-13> PMID: 23455336
14. Aust V, Knappstein K, Kunz HJ, Kaspar H, Wallmann J, Kaske M. Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 2013; 97 (6), 1091–1103. <https://doi.org/10.1111/jpn.12019> PMID: 23205592
15. Gonggrijp MA, Santman-Berends IMGA, Heuvelink AE, Buter GJ, van Schaik G, Hage JJ et al. Prevalence and risk factors for extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing *Escherichia coli* in dairy farms. J. Dairy Sci. 2016; 99 (11), 9001–9013. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11134> PMID: 27638264
16. Snow LC, Warner RG, Cheney T, Wearing H, Stokes M, Harris K et al. Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. Prev. Vet. Med. 2012; 106 (3–4), 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.03.009> PMID: 22552330
17. Büchter B. [Occurrence and characterisation of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in food-producing animals]. Dissertation. Freie Univ. Berlin. 2010. Available from: <https://refubium.fu-berlin.de/bitstream/handle/tub188/956/online.pdf?sequence=1&isAllowed=y&save=y>
18. Michael GB, Kaspar H, Siqueira AK, Freitas Costa E de, Corbellini LG, Kadlec K et al. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates collected from diseased food-producing animals in the GERM-Vet monitoring program 2008–2014. Vet. Microbiol. 2017; 200, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.023> PMID: 27634182
19. Merle R, Busse M, Rechter G, Meer U. [Regionalisation of Germany by data of agricultural structures]. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 2012; 8 (1–2), 52–59. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-125-52> PMID: 22372325
20. Müller KE, Englisch A, Tautenhahn A, Gäbler E, Forkmann A, Rösler U et al. [Development and testing of an evaluation system for hygiene, animal welfare and animal health on cattle farms]. Schriftenreihe des LfULG, Heft 5/2016. ISBN: 1867–2868
21. EUCAST. New S, I and R definitions. ESCMID—European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2019 [cited 19 April 2020]. Available from: <http://www.eucast.org/newsiandr/>
22. Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention (KRINKO) at the Robert Koch Institute (RKI). [Supplement to the commission recommendation for hospital hygiene and infection prevention (KRINKO) at the Robert Koch Institute (RKI) ‚Hygiene measures for infection or colonization with multidrug-resistant gram-negative bacilli‘ (2012) in the context of the redefined susceptibility testing category

- I by EUCAST: consequences for the definition of MDR-GNJ]. *Epid. Bull.* 2019;9:82–83. <https://doi.org/10.25646/5916>
23. Gröbner S, Linke D, Schütz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB et al. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *J. Med. Microb.* 2009; 58 (7), 912–922. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.005850-0> PMID: 19502377
 24. Strauß LM, Dahms C, Becker K, Kramer A, Kaase M, Mellmann A. Development and evaluation of a novel universal β -lactamase gene subtyping assay for blaSHV, blaTEM and blaCTX-M using clinical and livestock-associated *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015; 70 (3), 710–715. <https://doi.org/10.1093/jac/dku450> PMID: 25414200
 25. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 2013; 5 (1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019> PMID: 23757131
 26. Geser N, Stephan R, Kuhnert P, Zbinden R, Kaeppli U, Cemela N et al. Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in swine and cattle at slaughter in Switzerland. *J. Food Prot.* 2011; 74 (3), 446–449. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-372> PMID: 21375882
 27. Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet. Res.* 2012; 8, 21. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-21> PMID: 22397509
 28. Adler A, Sturlesi N, Fallach N, Zilberman-Barzilai D, Hussein O, Blum SE et al. Prevalence, risk factors, and transmission dynamics of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: a national survey of cattle farms in Israel in 2013. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(11), 3515–3521. <https://doi.org/10.1128/JCM.01915-15> PMID: 26311861
 29. Brunton LA, Reeves HE, Snow LC, Jones JR. A longitudinal field trial assessing the impact of feeding wastemilk containing antibiotic residues on the prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* in calves. *Prev. Vet. Med.* 2014; 117 (2), 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.08.005> PMID: 25172121
 30. Tetens JL, Billerbeck S, Schwenker JA, Hölzel CS. Short communication: Selection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in dairy calves associated with antibiotic dry cow therapy—A cohort study. *J. Dairy Sci.* 2019; 102 (12), 11449–11452. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16659> PMID: 31629516
 31. Montso KP, Dlamini SB, Kumar A, Ateba CN, Garcia-Perdomo HA. Antimicrobial Resistance Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Cattle Farms and Raw Beef in North-West Province, South Africa. *BioMed. Res. Int.* 2019; Article ID 4318306. <https://doi.org/10.1155/2019/4318306> PMID: 31915693
 32. Valat C, Auvray F, Forest K, Métayer V, Gay E, Peytavin de Garam C et al. Phylogenetic grouping and virulence potential of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in cattle. *Appl. Environ. Microb.* 2012; 78 (13), 4677–4682. <https://doi.org/10.1128/AEM.00351-12> PMID: 22522692
 33. Valentin L, Sharp H, Hille K, Seibt U, Fischer J, Pfeifer Y et al. Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *Int. J. Med. Microbiol.* 2014; 304 (7), 805–816. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.015> PMID: 25213631
 34. Coura FM, Araújo Diniz S de, Mussi JMS, Silva MX, Lage AP, Heinemann MB. Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2017; 62 (2), 139–144. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0480-9> PMID: 27787756
 35. Hille K, Felski M, Ruddat I, Woydt J, Schmid A, Friese A. Association of farm-related factors with characteristics profiles of extended-spectrum β -lactamase-/plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from German livestock farms. *Vet. Microbiol.* 2018; 223, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.07.022> PMID: 30173759
 36. Umair M, Mohsin M, Ali Q, Qamar MU, Raza S, Ali A et al. Prevalence and genetic relatedness of extended spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* among humans, cattle, and poultry in Pakistan. *Microb. Drug Resist.* 2019; 25 (9), 1374–1381. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0450> PMID: 31268408
 37. De Castro Stoppe N, Silva JS, Carlos C, Sato MIZ, Saraiva AM, Ottoboni LMM et al. Worldwide phylogenetic group patterns of *Escherichia coli* from commensal human and wastewater treatment plant isolates. *Front. Microbiol.* 2017; 8, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02512> PMID: 29312213
 38. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals and their putative impact on

- public health: a global perspective. *Clin. Microb. Infect.* 2012; 18 (7), 646–655. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x> PMID: 22519858
39. Käsbohrer A, Bakran-Lebl K, Irrgang A, Fischer J, Kämpf P, Schifmann A et al. Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing *E. coli* in food in Germany. *Vet. Microbiol.* 2019; 233, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.03.025> PMID: 31176413
 40. Wolfensberger A, Kuster SP, Marchesi M, Zbinden R, Hombach M. The effect of varying multidrug-resistance (MDR) definitions on rates of MDR gram-negative rods. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2019; 8, 193. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0614-3> PMID: 31798839
 41. Ibrahim DR, Dodd CER, Stekel DJ, Ramsden SJ, Hobman JL. Multidrug resistant, extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016; 92 (4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw013> PMID: 26850161
 42. Faccone D, Moredo FA, Giacoboni GI, Albornoz E, Alarcón L, Nievas VF et al. Multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *blaCTX-M* genes isolated from swine in Argentina. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 18, 160–162. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.03.011> PMID: 30926466
 43. Eisenberger D, Carl A, Balsliemke J, Kämpf P, Nickel S, Schulze G et al. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from milk samples of dairy cows with mastitis in Bavaria, Germany. *Microb. Drug Resist.* 2018; 24 (4), 505–510. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0182> PMID: 28953418
 44. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005> PMID: 16223952
 45. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. In: Tolmasky M, Alonso JC, editors. *Plasmids. Biology and impact in biotechnology and discovery.* ASM Press, Washington, DC. 2015. pp. 475–503
 46. Pfeifer Y, Eller C, Leistner R, Valenza G, Nickel S, Guerra B. [ESBL producer as human pathogens and the zoonotic reservoir]. *Hyg. Med.* 2013; 38 (7/8), 294–299
 47. Köck R, Daniels-Haardt I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24 (12), 1241–1250. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.004> PMID: 29654871
 48. Hommerich K, Ruddat I, Hartmann M, Werner N, Käsbohrer A, Kreienbrock L. Monitoring antibiotic usage in German dairy and beef cattle farms—A longitudinal analysis. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6, 244. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00244> PMID: 31404288
 49. Hyde RM, Remnant JG, Bradley AJ, Breen JE, Hudson CD, Davies PL et al. Quantitative analysis of antimicrobial use on British dairy farms. *The Veterinary record.* 2017; 181 (25), 683. <https://doi.org/10.1136/vr.104614> PMID: 29263292
 50. van Rennings L, Münchhausen C von, Hartmann M, Otilie H, Honscha W, Käsbohrer A et al. [Antibiotic usage and antibiotic sales in Germany in 2011—the situation of drug usage in veterinary medicine]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 2014; 127, 366–374. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-127-366> PMID: 25868164
 51. Dahms C, Hübner NO, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLoS one.* 2015; 10 (11), e0143326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143326> PMID: 26606146
 52. Santman-Berends IMGA, Gonggrijp MA, Hage JJ, Heuvelink AE, Velthuis A Lam TJGM et al. Prevalence and risk factors for extended-spectrum β -lactamase or AmpC-producing *Escherichia coli* in organic dairy herds in the Netherlands. *J. Dairy Sci.* 2016; 100:562–571. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11839> PMID: 27865491
 53. Beyer A, Baumann S, Scherz G, Stahl J, Bergen M von, Friese A et al. Effects of ceftiofur treatment on the susceptibility of commensal porcine *E. coli*—comparison between treated and untreated animals housed in the same stable. *BMC Vet. Res.* 2015; 11, 265. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0578-3> PMID: 26472561

S 1 Table. Primer sequences and sizes of PCR products used for the determination of bla-genes and the extended quadruplex phylo-typing method.

Primer Name	Sequence 5' → 3'	Target	Source
CTX-M universal FWD	CGCTTTGCGATGTGCAG	all <i>bla</i> _{CTX-M} genes	Gröbner et al. (2009)
CTX-M universal REV	ACCGCGATATCGTTGGT		
TEM universal FWD	ATGAGTATTCAACATTTCCG	all <i>bla</i> _{TEM} genes	Gröbner et al. (2009)
TEM universal REV	TTAATCAGTGAGGCACCTAT		
SHV-MP-1 FWD	TTCGCCTGTGTATTATCTCC	<i>bla</i> _{SHV-1} genes	Gröbner et al. (2009)
SHV-MP-1 REV	TCCGCTCTGCTTTGTTATTC		
CTX-M-9-MP FWD	GCAGTACAGACACAATACCG	<i>bla</i> _{CTX-M-9} genes	Gröbner et al. (2009)
CTX-M-9-MP REV	TATCATTGGTGGTGCCGTAG		
CTX-M-1 FWD	CGTCACGCTGTTGTTAGGAA	<i>bla</i> _{CTX-M-1} genes	Strauß et al. (2015)
CTX-M-1 REV	ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT		
chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	<i>chuA</i>	Clermont et al. (2013)
chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	<i>yjaA</i>	Clermont et al. (2013)
yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
TspE4C2.1b	CACTATTTCGTAAGGTACTCC	TspE4.C2	Clermont et al. (2013)
TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	<i>arpA</i>	Clermont et al. (2013)
ArpA1.r	TCTCCCCATAACCGTACGCTA		
ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	<i>arpA</i> (Group E-specific)	Clermont et al. (2013)
ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATTCCAAGAG		
trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	<i>trpA</i> (Group C-specific)	Clermont et al. (2013)
trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCCC		

S2 Table. Minimum inhibitory concentrations (mg/L) determined by VITEK® 2 technology for 99 ESBL-producing isolates

Isolate ID	AMP/AMX	AMS/AMC	TZP	CXM/CTM	CPD	CTX/CRO	CAZ	IMP	MEM	GEN	CIP	LVX	SXT	NFT
EC-1	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	≤20	64
EC-2	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	≤16
EC-3	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	≤16
EC-4	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	≤16
EC-5	>16	16	≤4	>65	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	≤20	64
EC-6	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	≤16
EC-7	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	≤20	≤16
EC-8	>16	16	≤4	>32	>32	>4	2	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	32
EC-9	>16	>16	≤4	>32	>4	16	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-10	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	8	0.25	1	≤20	16
EC-11	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	≤16
EC-12	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-13	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	≤16
EC-14	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	≤16
EC-15	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	>160	≤16
EC-16	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	>160	≤16
EC-17	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-18	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	≤20	≤16
EC-19	>16	>16	>64	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	0.5*	1	>160	64
ECG-20	>16	8	≤4	N/A	>4	4	16	0.5	≤0.25	≤1	0.5*	1	≤20	N/A
EC-21	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-22	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	8	>2	>4	>160	≤16
EC-23	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	8	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	4	≤20	≤16
EC-24	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	16	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	4	≤20	≤16

Isolate ID	AMP/AMX	AMS/AMC	TZP	CXM/CTM	CPD	CTX/CRO	CAZ	IMP	MEM	GEN	CIP	LVX	SXT	NFT
EC-25	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	8	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	4	≤20	≤16
ECG-26	>16	8	≤4	N/A	>4	>32	>32	≤0.25	≤0.25	≤1	0.5*	1	≤20	N/A
ECG-27	>16	4	≤4	N/A	>4	4	16	0.5	≤0.25	≤1	0.5*	1	≤20	N/A
EC-28	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
ECG-29	>16	4	≤4	N/D	>4	4	16	0.5	≤0.25	≤1	0.5*	1	≤20	N/D
EC-30	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	0.5*	1	≤20	≤16
EC-31	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	≤16
EC-32	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	0.25	≤20	64
EC-34	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	>160	32
EC-35	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	>160	32
EC-36	>16	>16	32	>32	>4	>32	16	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	≤20	≤16
KP-37	>16	16	8	>32	>4	4	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	1	1	>160	N/A
EC-38	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	≤16
EC-39	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	≤20	32
KP-40	>16	16	≤4	>32	>4	4	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	1	1	>160	N/A
EC-41	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	≤16
EC-42	>16	>16	16	>32	4	>32	16	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	≤20	≤16
EC-43	>16	>16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	32
EC-44	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	>160	64
EC-45	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-46	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-47	>16	≤2	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	≤16
EC-48	>16	≤2	16	>32	>4	8	4	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-49	>16	≤2	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	≤16
EC-50	>16	>16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	32
EC-51	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	>160	≤16
EC-52	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	>160	≤16
EC-53	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	>160	64

Isolate ID	AMP/AMX	AMS/AMC	TZP	CXM/CTM	CPD	CTX/CRO	CAZ	IMP	MEM	GEN	CIP	LVX	SXT	NFT
EC-54	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	8	1	2	≤20	≤16
EC-55	>16	16	≤4	>32	>4	32	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	≤0.25	0.5	>160	≤16
ECG-56	>16	>16	8	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	>8	1	1	>160	N/A
EC-59	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	>160	≤16
EC-60	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	>160	≤16
EC-61	>16	16	≤4	>32	>4	32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	>160	≤16
EC-62	>16	≤2	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	≤16
EC-63	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	32
EC-64	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	32
EC-65	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	>160	≤16
EC-66	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	2	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	≤20	≤16
EC-67	>16	>16	16	>32	>4	>32	16	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	64
EC-68	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	0.25	≤20	≤16
EC-69	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-70	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	0.25	≤20	≤16
EC-71	>16	8	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	4	>160	32
EC-72	>16	8	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	4	>160	≤16
EC-73	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	≤16
EC-74	>16	>16	8	>32	>4	>32	16	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	≤16
EC-75	>16	>16	16	>32	>4	>32	16	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	≤16
EC-76	>16	>16	8	>32	>4	>32	16	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	≤16
EC-77	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	>8	>2	>4	>160	≤16
EC-78	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	0.25	8	>2	>4	>160	≤16
EC-79	>16	16	≤4	>32	>4	>32	16	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	>160	≤16
EC-80	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	≤20	≤16
EC-81	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	>160	64
EC-82	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	>160	64
EC-83	>16	16	≤4	>32	>4	16	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	16

Isolate ID	AMP/AMX	AMS/AMC	TZP	CXM/CTM	CPD	CTX/CRO	CAZ	IMP	MEM	GEN	CIP	LVX	SXT	NFT
EC-84	>16	16	≤4	>32	>4	16	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	≤16
EC-85	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-86	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-87	>16	16	≤4	>32	>4	>32	16	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	>160	64
EC-88	>16	≤2	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	≤20	128
EC-89	>16	16	≤4	>32	>4	16	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	32
EC-90	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	8	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	4	>160	≤16
EC-91	>16	>16	>64	>32	>4	>32	2	≤0.25	≤0.25	≤1	0.5*	1	>160	64
EC-92	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	0.5*	1	≤20	≤16
EC-93	>16	16	≤4	>32	>4	32	4	≤0.25	≤0.25	8	>2	>4	>160	≤16
EC-94	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-95	>16	16	≤4	>32	>4	>32	2	≤0.25	≤0.25	4	>2	>4	>160	≤16
EC-96	>16	16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-97	>16	16	≤4	>32	>4	>32	4	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	1	≤20	≤16
EC-98	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-99	>16	16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-100	>16	>16	≤4	>32	>4	8	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	≤0.12	≤20	≤16
EC-101	>16	16	≤4	>32	>4	16	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	≤0.25	0.5	>160	≤16
EC-102	>16	>16	≤4	>32	>4	>32	≤1	≤0.25	≤0.25	≤1	>2	>4	>160	≤16

Values which were interpreted as susceptible are shaded in light green; those interpreted as resistant are shaded in light red; MICs that are not coloured, indicate intermediary susceptibility; * MIC in area of technical uncertainty

EC – *E. coli*, ECG – *Enterobacter cloacae* group, KP – *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*; AMP – ampicillin, AMX – amoxicillin, AMS – ampicillin-sulbactam, AMC – amoxicillin-clavulanic acid, TZP – piperacillin-tazobactam, CXM – cefuroxime, CTM – cefotiam, CPD – cefpodoxime, CTX – cefotaxime, CRO – ceftriaxone, CAZ – ceftazidime, IMP – imipenem, MEM – meropenem, GEN – gentamicin, CIP – ciprofloxacin, LVX – levofloxacin, SXT – trimethoprim-sulfamethoxazole, NIT – nitrofurantoin

S3 Table. Gross amounts of antibiotic substance classes (in g) used on the farms in total and in newborn calves.

	Farm 1		Farm 2		Farm 3		Farm 4		Farm 5		Farm 6		Farm 7		Farm 9		Farm 10	
	Total	Calves	Total	Calves	Total	Calves	Total	Calves	Total	Calves	Total	Calves	Total	Calves	Total	Calves	Total	Calves
AMG	237.7	0.0	161.3	2.8	380.8	135.5	220.1	0.0	260.2	0.0	74.3	0.0	900.3	381.3	315.5	19.3	85.5	0.0
PEN	8241.1	4.2	4356.0	23.4	15575.8	429.5	14571.9	738.7	13652.4	125.6	2486.7	25.8	21744.4	1409.5	6785.6	486.6	3004.7	227.3
CEP	1557.9	0.0	210.2	0.2	437.8	0.5	454.9	0.0	338.7	0.0	102.1	0.0	1617.7	0.0	3011.4	0.0	22.1	0.0
AMP	93.6	0.0	175.2	36.6	256.5	135.0	3304.8	526.2	25.5	18.0	98.8	42.8	3280.8	74.1	379.1	40.7	412.5	36.9
FLQ	521.9	0.0	437.7	28.4	1268.4	141.6	1097.0	8.0	797.0	0.0	10.4	0.0	1014.7	137.0	1498.1	19.5	696.6	27.0
TRI	89.4	0.0	186.5	1.6	455.7	12.7	165.6	0.0	0.0	0.0	21.4	1.8	809.9	182.9	83.0	0.0	256.8	0.0
ION	1620.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	97.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
LIN	0.0	0.0	0.0	0.0	7.9	0.0	108.2	0.0	157.1	0.0	0.0	0.0	125.2	72.8	51.2	0.0	0.0	0.0
MAC	2.6	0.3	6.9	1.7	100.8	0.0	66.9	1.3	1654.0	25.1	8.3	2.9	5597.9	0.0	42.0	0.2	0.0	0.0
PLM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PLP	0.0	0.0	15.8	7.7	224.5	211.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SUL	446.8	0.0	932.6	8.2	2278.4	63.6	828.0	0.0	0.0	0.0	107.0	9.0	4049.5	914.3	2178.8	0.0	1284.0	0.0
TET	2495.3	0.0	1585.1	0.0	4482.7	110.9	1320.0	0.0	1259.7	0.0	167.2	0.0	9933.4	1.3	640.5	0.0	104.9	2.5

AMG – aminoglycosides, PEN – penicillins, CEP – cephalosporins, AMP – amphenicols, FLQ – fluoroquinolones, TRI – trimethoprim, ION – ionophores, LIN – lincosamides, MAC – marolidides, PLM – pleuromutilins, PLP – polypeptides, SUL – sulfonamides, TET – tetracyclines

4 Diskussion

Die Ziele dieses Projekts waren die Untersuchung der Prävalenz von ESBL-E bei neugeborenen Kälbern auf Milchviehbetrieben und die Identifizierung möglicher Risikofaktoren, die zu einem hohen Auftreten von ESBL-E-Trägern beitragen. ESBL-E wurden in allen zehn untersuchten Betrieben der Studie nachgewiesen und in 96,5 % der beprobten Tiere. Dies ist deutlich höher als in anderen Studien aus Deutschland, der Schweiz und Israel, die eine Gesamtprävalenz von 8,4 % bis 56,2 % und bis zu 26,2 % bei erkrankten Kälbern fanden (ADLER et al. 2015, GESER et al. 2012, GESER et al. 2011, MICHAEL et al. 2017, REIST et al. 2013, SCHMID et al. 2013). Wesentliche Unterschiede lassen sich auf die Betriebsstrukturen und -praktiken, das Alter der Tiere und die Probenahme auf den Höfen oder im Schlachthof zurückführen (ADLER et al. 2015, REIST et al. 2013, SCHMID et al. 2013). Ein ähnlicher Anteil (97,8 %) von Kälbern, die ESBL-E ausscheiden, wurde jedoch in Großbritannien gefunden (WATSON et al. 2012). Die höchste Prävalenz von ESBL-E findet sich in der Regel bei Jungtieren, insbesondere bei säugenden Kälbern, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt, wobei mit zunehmendem Alter die Prävalenz allmählich abnimmt (ADLER et al. 2015, BRUNTON et al. 2014, REIST et al. 2013, SCHMID et al. 2013). Aufgrund des Studiendesigns als Punktprävalenz-Analyse wurden ältere Tiere in unserer Studie leider nicht beprobt. Somit kann keine Aussage über die weitere Entwicklung der Prävalenzen getroffen werden.

Die durchschnittliche Menge an ESBL-produzierenden Bakterien pro g Kot war deutlich höher als anderswo berichtet (TETENS et al. 2019). Ein valider Vergleich verschiedener Studien ist allerdings aufgrund unterschiedlicher Studiendesigns, Probennahmetechniken und Screening-Protokolle schwierig. Obwohl wir uns gegen einen Voranreicherungsschritt entschieden haben, war die in unserer Studie ermittelte Prävalenz im Vergleich zu anderen Studien, die einen Voranreicherungsschritt durchführten, deutlich höher (GESER et al. 2012, GESER et al. 2011, SCHMID et al. 2013).

Die große Mehrzahl der weiter charakterisierten Isolate waren *E. coli*, gefolgt von *Enterobacter (E.) cloacae* und *Klebsiella (K.) pneumoniae* ssp. *pneumoniae*. Diese Verteilung stimmt mit zwei Studien aus der Schweiz überein, in denen *E. coli* die vorherrschende ESBL-produzierende Spezies in Rinderkot war, während ESBL-produzierende *E. cloacae* in deutlich geringerem Umfang gefunden wurden (GESER et al. 2012, REIST et al. 2013).

Das Vorkommen von ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* in Rinderkot wurde erst kürzlich beschrieben (MONTSO et al. 2019).

Die Mehrheit der *E. coli*-Isolate wurde eindeutig der Phylogruppe C zugeordnet, gefolgt von den Phylogruppen A und E. Bei knapp 20 % der *E. coli* war die eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Phylogruppen A oder C mit den PCRs von CLERMONT et al. (2013) nicht möglich. Diese Isolate werden daher als Mitglieder der Phylogruppe A/C bezeichnet. Insgesamt überwogen Isolate, die den Phylogruppen C, A/C und A angehörten. Diese Verteilung steht im Gegensatz zu anderen Studien, in denen die Phylogruppen A und B1 bei ESBL-E-Isolaten von gesunden Tieren dominierten (COURA et al. 2017, HILLE et al. 2018, MICHAEL et al. 2017, UMAIR et al. 2019, VALAT et al. 2012, VALENTIN et al. 2014). Die Unterschiede im Vergleich zu anderen Studien könnten sich hauptsächlich darin begründen, dass ein Großteil der anderen Studien PCR-Protokolle verwendeten, die nicht zwischen den Phylogruppen A und C unterscheiden (HILLE et al. 2018, MICHAEL et al. 2017, UMAIR et al. 2019, VALENTIN et al. 2014). Unterschiede in der Phylogruppenverteilung könnten jedoch auch auf die geografische Lage, das Klima, die Ernährungsgewohnheiten oder andere Faktoren zurückzuführen sein (CASTRO STOPPE et al. 2017).

Das dominierende Auftreten von *bla*CTX-M-Genen, insbesondere der Gruppe 1, deckt sich mit anderen deutschen und europäischen Studien, in denen am häufigsten CTX-M Gruppe 1 gefolgt von CTX-M Gruppe 9 nachgewiesen wurde (EWERS et al. 2012, GESER et al. 2012, HILLE et al. 2018, MICHAEL et al. 2017, SCHMID et al. 2013). Die Prävalenz von *bla*TEM in *E. coli*, entweder in Kombination mit *bla*CTX-M oder allein, erwies sich dagegen im Vergleich zu anderen Studien höher (KAESBOHRER et al. 2019, VALENTIN et al. 2014). Vier *E. coli* waren negativ für CTX-M, TEM und SHV.

Von den ESBL-produzierenden *E. cloacae* und *K. pneumoniae* trug ein *E. cloacae* *bla*CTX-M und *bla*TEM, während die restlichen vier und die beiden *K. pneumoniae* positiv für *bla*SHV waren. Studien zu ESBL-E außer *E. coli* bei Tieren sind rar. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen war in einer kürzlich durchgeführten südafrikanischen Studie *bla*SHV eher das dominante Gen in *E. coli*-Isolaten als in *K. pneumoniae* (MONTSO et al. 2019). Nach bestem Wissen der Autoren gibt es bisher nur einen Bericht aus der Schweiz über ein *E. cloacae*-Isolat aus einem Lamm, das *bla*SHV und *bla*TEM trug (GESER et al. 2012).

Wir charakterisierten ESBL-produzierende Bakterien zusätzlich auf ihre Eigenschaft als drei- oder vierfach multiresistente Gramnegative (3- bzw. 4-MRGN). Die Definition der KOMMISSION FÜR KRANKENHAUSHYGIENE UND INFEKTIONSPRÄVENTION

(KRINKO) BEIM ROBERT KOCH-INSTITUT (2012) ist Teil einer nationalen Leitlinie, die als Leitfaden für Maßnahmen zur Infektionsprävention und -kontrolle im humanen klinischen Umfeld dient (WOLFENSBERGER et al. 2019). Unter Berücksichtigung des One-Health-Konzepts und des Risikos einer Übertragung zwischen Tier und Mensch in beide Richtungen sind Daten über das Auftreten dieser multiresistenten Bakterien von großer Bedeutung für die Risikobewertung in der öffentlichen Gesundheit und der Tiergesundheit. Neben der Resistenz gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen waren 60 % der ESBL-produzierenden Isolate zusätzlich resistent gegenüber einer oder mehreren Antibiotikaklassen, was sich mit vorhergehenden Studien bei Rindern (GESER et al. 2012, HILLE et al. 2018, IBRAHIM et al. 2016, SCHMID et al. 2013) und anderen Nutztieren (FACCONE et al. 2019, GESER et al. 2012, HILLE et al. 2018) deckt. Übereinstimmend mit SCHMID et al. (2013) und EISENBERGER et al. (2018) war ein hoher Anteil der Isolate (46,5 %) auch gegenüber Fluorchinolonen resistent. Dieses Phänomen kann durch eine Kolo-kalisation Plasmid-vermittelter Resistenzgene erklärt werden. Aber auch ohne Plasmid-kodierte Unempfindlichkeit wurde bereits eine starke Assoziation zwischen Chinolon-Resistenz und ESBL-Produktion beschrieben (JACOBY et al. 2015, PATERSON und BONOMO 2005). Mehr als die Hälfte der Isolate wurden weiterhin als 3-MRGN klassifiziert. Dieser Fund war ähnlich wie die Ergebnisse von ESBL-produzierenden *E. coli* und *K. pneumoniae*, die vom Menschen isoliert wurden (PFEIFER et al. 2013). Keines der Isolate erwies sich als 4-MRGN, d. h. alle waren empfindlich gegenüber Imipenem und Meropenem. Dies steht im Gegensatz zu einer Studie aus Großbritannien, die einen instabilen Imipenem-resistenten Phänotyp bei 1,2 % ihrer *E. coli*-Isolate beschrieb (IBRAHIM et al. 2016). In Europa ist das Screening auf Carbapenem-Resistenz bei Nutztieren immer noch unterrepräsentiert und die Prävalenz in europäischen Ländern wurde mit <1 % angegeben (KÖCK und CUNY 2018). In Deutschland wurden Carbapenem-resistente Enterobakterien bisher hauptsächlich mit Schweinen und Hühnern assoziiert, während nur ein einziger Bericht über Ertapenem-Resistenz in *E. coli* aus einem Rinderbetrieb veröffentlicht wurde (KÖCK und CUNY 2018, SCHMID et al. 2013).

Des Weiteren nahmen wir den Antibiotikaverbrauch auf Betriebsebene sowie in den einzelnen Altersklassen auf. Im Gegensatz zu anderen europäischen Ländern wie Dänemark oder den Niederlanden besteht in Deutschland nach aktueller Rechtsprechung keine Meldepflicht für den Antibiotikaeinsatz bei Milchviehkälbern (HOMMERICH et al. 2019). Daher sind die hier vorgestellten Ergebnisse stark von der Qualität der Dokumentation auf Betriebsebene abhängig. Leider konnten die Daten zum Antibiotikaeinsatz auf einem Betrieb aufgrund unzureichender Dokumentation nicht ausgewertet werden. Lediglich 12 % der Kälber wurden

vor Probenentnahme antibiotisch behandelt. Auf zwei Betrieben wurde keinem der beprobten Kälber ein Antibiotikum verabreicht. Penicilline wurden bei Kälbern auf 8 von 10 Betrieben am häufigsten eingesetzt, während die anderen beiden Betriebe hauptsächlich Ampenicole verabreichten. Auf Herdenebene waren Penicilline in allen Betrieben die vorherrschende Substanzklasse. Ähnliche Ergebnisse wurden für Milchviehherden in Großbritannien (HYDE et al. 2017) und Rinder in Deutschland (VAN RENNINGS et al. 2014) berichtet. Allerdings differenzierten VAN RENNINGS et al. (2014) nicht nach Produktionsart oder Altersgruppe. Fluorchinolone wurden in sechs Betrieben eingesetzt, was den hohen Anteil an resistenten Isolaten in unserer Studie erklären könnte. Cephalosporine wurden auf keinem der Betriebe an Kälber verabreicht. Ein Vergleich des Antibiotikaeinsatzes unter den Projektbetrieben hinsichtlich der Bruttomengen an antibiotischer Substanz war leider nicht möglich, da aus den durch das Herdenmanagementprogramm ermittelbaren Tierzahlen kein zuverlässiger Behandlungsindex berechnet werden konnte.

Eine Korrelation mit der Verfütterung von Sperrmilch an Kälber, die potenziell Rückstände antimikrobiell wirksamer Substanzen enthielt, konnte in unserer Studie nicht dargestellt werden. Auf den drei Betrieben, die keine Sperrmilch verfütterten, traten ESBL-E ebenso auf.

Die im Rahmen der Hygieneanalyse ermittelten Gesamthygienekennziffern (Definition s. Veröffentlichung) der Projektbetriebe lagen zwischen 1,90 und 2,64. Im Durchschnitt wurden die höchsten Punktzahlen für die Teilbereiche "Stallklima" und "Melken" erreicht, während die Teilbereiche "Biosicherheit" und "Reinigung und Desinfektion" am schlechtesten bewertet wurden. Es ist zu beachten, dass die Hygieneanalyse nicht durchgeführt wurde, um Risikofaktoren für das Auftreten von ESBL-E zu identifizieren, sondern um die Prävalenz von Faktorenenerkrankungen wie Lahmheit, Mastitis oder Neugeborenenenddurchfall zu minimieren. In anderen Studien wurden mehrere Faktoren identifiziert, die zu einem Auftreten von ESBL-E beitragen, wie eine unzureichende Sauberkeit von Kälberställen und Abkalbebuchten, Überbelegung, keine Verwendung von Zitzenversiegeln beim Trockenstellen, die parenterale Behandlung klinischer Mastitis, die Fütterung von Milchaustauschern an Kälber oder der Einsatz von Cephalosporinen der dritten und vierten Generation (ADLER et al. 2015, DAHMS et al. 2015, GONGGRIJP et al. 2016, HILLE et al. 2018, SANTMAN-BERENDS et al. 2017). Letzteres wird jedoch kontrovers diskutiert (SANTMAN-BERENDS et al. 2017). Darüber hinaus wurde das Vorhandensein von Schweinemastbetrieben in geringer Entfernung zu einem Rinderstall mit dem Auftreten von ESBL-E in Verbindung gebracht, was auf eine staubgebundene Übertragung von Stall zu Stall, wie auch Bucht zu Bucht hinweisen könnte (BEYER et al. 2015, SANTMAN-BERENDS et al. 2017).

Aufgrund der in unserer Studie festgestellten Betriebsprävalenz von 100 %, konnten wir lediglich den Einsatz von Beta-Laktamen als die mengenmäßig dominierende Substanzklasse auf Betriebsebene mit dem Auftreten von ESBL-E in Verbindung bringen. Weitere Risikofaktoren ließen sich auf der Basis unseres Datensatzes nicht identifizieren. Überraschenderweise fanden sich auf Betrieb 6, mit den insgesamt schlechtesten Hygienewerten, die höchste Anzahl von Kälbern mit für ESBL-E negativen Kotproben (6/7 Kälber). Zu den Faktoren, die zu dem hohen Anteil an ESBL-negativen Kälbern beigetragen haben könnten, gehören die kleinste Herdengröße unter den Projektbetrieben (319 Milchkühe), keine Verfütterung von Sperrmilch, geringer Einsatz von Fluorchinolonen auf Herdenebene und der mengenmäßig häufigere Einsatz von Amphenicolen bei Kälbern anstelle von Beta-Laktamen. Leider erwies sich keiner dieser Faktoren als statistisch signifikant.

Das Punktprävalenz-Design und die kleine Stichprobenzahl, die auf Kälber jünger als zwei Wochen beschränkt war, können als die größten Einschränkungen der vorliegenden Studie angesehen werden. Das Auftreten von ESBL-E ist höchstwahrscheinlich ein multifaktorieller Prozess. Daher ist eine Längsschnittstudie erforderlich, die den Antibiotikaeinsatz und andere relevante Managementfaktoren, die Tiergesundheit wie auch den ESBL-E-Status von Kühen und Kälbern aller Altersklassen einbezieht, um Risikofaktoren zu identifizieren, die zu einer hohen Prävalenz von ESBL-E in Milchviehherden beitragen.

Obwohl beschrieben wurde, dass die ESBL-Prävalenz mit zunehmendem Alter der Rinder abnimmt, erfordern die hohe Prävalenz sowie die hohe Anzahl an ESBL-produzierenden Bakterien, die ausgeschieden werden, Strategien, um ein Eindringen von ESBL-E in das Kälberaufzuchtssystem frühzeitig zu verhindern. Dies können beispielsweise ein verantwortungsbewusster und selektiver Einsatz antibiotischer Trockensteller und sorgfältige Hygiene in Abkalbeboxen und Kälberställen sein. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den oder die Eintrittspunkt(e) von ESBL-E in die Kälberaufzucht zu definieren.

5 Zusammenfassung

Verfasser Jil Karlotta Waade

Titel Multiresistente Enterobakterien bei neugeborenen Milchviehkälbern in Sachsen

Institut Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im März 2021

Bibliografische Angaben: 50 Seiten, 1 Abbildung, 2 Tabellen, 107 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Multiresistenz, Enterobakterien, ESBL, Kälber, Antibiotikaeinsatz, Rinderhaltung

Einleitung: Das Auftreten von multiresistenten Bakterien in der Bevölkerung und in Krankenhäusern sowie in der Tierhaltung hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Die weltweite Zunahme multiresistenter gramnegativer Bakterien, insbesondere Enterobakterien wie *Klebsiella (K.) pneumoniae* und *Escherichia (E.) coli*, gibt Anlass zu wachsender Besorgnis und ist Gegenstand zahlreicher Studien.

Ziele der Untersuchungen: Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte die Prävalenz von Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (ESBL)-produzierenden Enterobakterien (ESBL-E) bei Milchkälbern untersucht und Risikofaktoren für deren Auftreten unter Verwendung von Daten zu Antibiotikaeinsatz, Betriebshygiene und Tiergesundheit identifiziert werden.

Tiere, Material und Methoden: Zehn Betriebe mit einem Median von 781 Milchkühen (319-1701) nahmen an der Studie teil. Die Betriebe wurden zweimal im Abstand von 7-11 Monaten besucht und Kotproben von jeweils 10 neugeborenen Kälbern gesammelt. Alle untersuchten Kälber waren jünger als zwei Wochen mit einem Durchschnittsalter von 6,8 ($\pm 3,9$) Tagen. Die Kotproben wurden 1:10 verdünnt und im Doppelansatz auf Brilliance™ ESBL-Agar plattiert. Nach 24 Stunden bei 37 °C wurden die Kolonien gezählt und die Gesamtanzahl der koloniebildenden Einheiten (cfu)/ml berechnet. Die Bakterienart wurde biochemisch identifiziert. Die ESBL-Produktion wurde mittels MICRONAUT-S β -Lactamase-Platten phänotypisch bestätigt. Zusätzlich wurden weitere Resistenztest mit der VITEK® 2 Technologie durchgeführt. Die Bestimmung der

Phylogruppen der *E. coli*-Isolate und das Screening auf *bla*-Gene wurde mittels PCR durchgeführt. Der Hygienestatus der Betriebe wurde mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens erfasst und bewertet und Daten zu Tiergesundheit und Antibiotikaeinsatz wurden über Tier-Scoring und das Herdemanagementprogramm gesammelt.

Ergebnisse: ESBL-E konnten in allen Betrieben und 96,5 % der Kotproben nachgewiesen werden. Der dominierende Anteil der ESBL-produzierenden Isolate waren *E. coli* (92,9 %), gefolgt von *Enterobacter (E.) cloacae* (5,1 %) und *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (2,0 %). Die Mehrheit der *E. coli*-Isolate wurde eindeutig der Phylogruppe C zugeordnet (25,0 %), gefolgt von den Phylogruppen A (15,2 %) und E (14,1 %). Die CTX-M-Gruppe 1 wurde am häufigsten nachgewiesen (80,4 %). Neben der Resistenz gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen war die Mehrheit der Isolate zusätzlich gegenüber einer oder mehrerer weiterer Substanzklassen resistent, wobei ein hoher Anteil gegenüber Fluorchinolonen resistent war. 52,5 % der Isolate wurden außerdem als dreifach multiresistente gramnegative Bakterien (3MRGN) gemäß der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention charakterisiert. Keines der Isolate war 4MRGN, d.h. keines zeigte eine Carbapenem-Resistenz. Penicilline wurden bei Kälbern in den meisten Betrieben am häufigsten verabreicht und stellten auf Herdenebene in allen Betrieben die vorherrschende Substanzklasse dar. Insgesamt war die Anzahl der Kälber, die vor der Probenahme behandelt wurden, eher gering (11,7 %). Analysen der Daten zum Betriebsmanagement ergaben Schwächen bei der Biosicherheit und der Reinigung und Desinfektion. Neben Beta-Laktam-Antibiotika als den am häufigsten verwendeten Antibiotika konnten keine weiteren Risikofaktoren identifiziert werden.

Schlussfolgerungen: Die Prävalenz von ESBL-E in unserer Studie war außergewöhnlich hoch. Obwohl die Prävalenz mit zunehmendem Alter der Rinder nachgewiesenermaßen abnimmt, sollten unsere Ergebnisse Anlass zur Entwicklung von Strategien sein, die den Eintrag von ESBL-E in das Kälberaufzuchtssystem frühzeitig verhindern. Dies können beispielsweise der verantwortungsbewusste Einsatz antibiotischer Trockensteller und eine sorgfältige Hygiene in Abkalbeboxen und Kälberställen sein. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den/die Eintrittspunkt(e) von ESBL-E in die Kälberaufzucht zu definieren.

6 Summary

Author Jil Karlotta Waade

Title Multiresistant enterobacteria in newborn dairy calves in Saxony, Germany

Institute Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in March 2021

Bibliographic data: 50 pages, 1 figure, 2 tables, 107 references

Key words: Multi-drug resistance, enterobacteria, ESBL, calves, antimicrobial use, cattle husbandry

Introduction: The occurrence of multidrug-resistant bacteria in the community and in hospitals as well as in animal husbandry has increased rapidly over the last decades. The increasing occurrence of multidrug-resistant gram-negative bacteria, especially enterobacteria such as *Klebsiella (K.) pneumoniae* and *Escherichia (E.) coli*, is of growing concern and has been subject to many studies worldwide.

Study aims: We studied the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in dairy calves as part of a routine health check protocol. In addition, data regarding antimicrobial use (AMU), farm hygiene, and farm management were collected in order to identify possible risks for ESBL occurrence.

Animals, material and methods: Ten farms participated in the study with a median of 781 milking cows (319-1701). All calves investigated were younger than two weeks with an average age of 6.8 (± 3.9) days. The farms were visited and samples were collected twice at an interval of 7-11 months. Faecal samples diluted 1:10, were plated onto *Brilliance*TM ESBL agar in duplicates. After 24 hours at 37 °C, colonies were counted and total colony forming units (cfu)/ml calculated. Bacteria species were identified biochemically. ESBL-production was phenotypically confirmed using the MICRONAUT-S β -Lactamases system. Additionally, antimicrobial susceptibility was tested using VITEK[®] 2 technology. Phylotyping of *E. coli* isolates and screening for *bla* genes was performed by PCR. The hygienic status of the farms was recorded and rated using a standardized

questionnaire developed for dairy cattle and data on animal health and antimicrobial treatment were collected through animal scoring and the herd management program.

Results: ESBL-producing enterobacteria were detected on all farms and 96.5 % of calves investigated shed ESBL-positive bacteria. Of all ESBL-producing isolates, the majority were *E. coli* (92.9 %), followed by *Enterobacter cloacae* (5.1 %) and *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (2.0 %). The majority of *E. coli* isolates was clearly assigned to phylogroup C (25.0 %), followed by phylogroups A (15.2 %) and E (14.1 %). CTX-M group 1 was most frequently detected (80.4 %). Besides resistance to penicillins and cephalosporins, the majority of isolates was also resistant to one or more antibiotic classes, with a high proportion being resistant against fluoroquinolones. 52.5 % of isolates were further characterised as threefold multidrug resistant gram-negative bacteria (3MDR-GNB) according to the German Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention. None of the isolates were 4MDR-GNB, i.e. none revealed carbapenem-resistance. Penicillins were the most frequently administered antibiotics to calves on most farms and were the predominant substance class at herd level on all farms. Overall, the number of calves treated prior to sampling was rather low (11.7 %). Analyses of data regarding the farm management identified weaknesses in biosecurity and cleaning and disinfection. Besides beta-lactam antibiotics being the most commonly used antibiotics no other risk factors could be identified.

Conclusions: The prevalence of ESBL-carriers in dairy calves in our study was exceptionally high. Although ESBL-E-prevalence has been described to decrease with increasing age of cattle, our findings should be motivation to develop strategies to prevent the entry of ESBL-E into the calf rearing system at an early stage such as prudent use of antimicrobials during drying off and diligent hygiene in calving pens and calf housing. Further investigation is needed, to define the entry point(s) of ESBL-E into calf rearing.

7 Literaturverzeichnis

- Adler A, Sturlesi N'a, Fallach N, Zilberman-Barzilai D, Hussein O, Blum SE et al. Prevalence, risk factors, and transmission dynamics of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: a national survey of cattle farms in Israel in 2013. *J Clin Microbiol.* 2015;53(11):3515–21.
- Al-Bayssari C, Dabboussi F, Hamze M, Rolain J-M. Detection of expanded-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria in the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(9):1139–58.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B, Biol Sci.* 1980;289(1036):321–31.
- Barthélémy M, Péduzzi J, Bernard H, Tancrède C, Labia R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim Biophys Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1992;1122(1):15–22.
- Bauernfeind A, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Röhnisch T, Schweighart S et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection.* 1992;20(3):158–63.
- Bauernfeind A, Schweighart S, Grimm H. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 1990;18(5):294–8.
- Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E et al. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(3):616–20.
- Beyer A, Baumann S, Scherz G, Stahl J, Bergen M von, Friese A et al. Effects of ceftiofur treatment on the susceptibility of commensal porcine *E.coli*-comparison between treated and untreated animals housed in the same stable. *BMC Vet Res.* 2015;11:265.
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(1):42–51.
- Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miró E et al. ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol.* 2006;118(3-4):299–304.
- Boerlin P, White DG. Antimicrobial Resistance and Its Epidemiology. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, Hrsg. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2013. p. 21–40.

- Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1–14.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):933-51, table of contents.
- Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Muniesa M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid.* 2015;79:1–7.
- Brunton LA, Reeves HE, Snow LC, Jones JR. A longitudinal field trial assessing the impact of feeding waste milk containing antibiotic residues on the prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* in calves. *Prev Vet Med.* 2014;117(2):403–12.
- Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(3):259–63.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969–76.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211–33.
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol.* 2012;3:110.
- Cantón R, Morosini MI, Martín O, La Maza OMS de, La Pedrosa EGG de. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:53–62.
- Castro Stoppe N de, Silva JS, Carlos C, Sato MIZ, Saraiva AM, Ottoboni LMM et al. Worldwide Phylogenetic Group Patterns of *Escherichia coli* from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates. *Front Microbiol.* 2017;8:2512.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(1):58–65.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals: CLSI supplement VET08. Wayne, PA, USA; 2018.
- Coura FM, Araújo Diniz S de, Mussi JMS, Silva MX, Lage AP, Heinemann MB. Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia Microbiol (Praha).* 2017;62(2):139–44.

- Dahms C, Hübner N-O, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A. Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. PLoS ONE. 2015;10(11):e0143326.
- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. Int J Med Microbiol. 2013;303(6-7):305–17.
- Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature. 1965;208(5007):239–41.
- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(3):417–33.
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C et al. Antibiotic resistance is ancient. Nature. 2011;477(7365):457–61.
- Dierikx C, van der Goot J, Fabri T, van Essen-Zandbergen A, Smith H, Mevius D. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. J Antimicrob Chemother. 2013;68(1):60–7.
- Dohmen W, Bonten MJM, Bos MEH, van Marm S, Scharringa J, Wagenaar JA et al. Carriage of extended-spectrum β -lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. Clin Microbiol Infect. 2015;21(10):917–23.
- Eisenberger D, Carl A, Balsliemke J, Kämpf P, Nickel S, Schulze G et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Milk Samples of Dairy Cows with Mastitis in Bavaria, Germany. Microb Drug Resist. 2018;24(4):505–10.
- Endimiani A, Rossano A, Kunz D, Overesch G, Perreten V. First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from broilers, swine, and cattle in Switzerland. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(1):31–8.
- Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The Integron: Adaptation On Demand. Microbiol Spectr. 2015;3(2):MDNA3-0019-2014.
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Basel, Schweiz; 2017 [Stand: 2019 Dez 28]. Verfügbar unter: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf.
- Evans BA, Amyes SGB. OXA β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2014;27(2):241–63.
- Ewers C, Bethke A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion

- animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(7):646–55.
- Faccone D, Moredo FA, Giacoboni GI, Albornoz E, Alarcón L, Nieves VF et al. Multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *blaCTX-M* genes isolated from swine in Argentina. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;18:160–2.
- Fauler J. Wirkmechanismen von Antibiotika und bakterielle Resistenz. Prävention und Gesundheitsförderung. 2014;9(3):159–65.
- Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res.* 2012;8:21.
- Geser N, Stephan R, Kuhnert P, Zbinden R, Kaeppli U, Cernela N et al. Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in swine and cattle at slaughter in Switzerland. *J Food Prot.* 2011;74(3):446–9.
- Gonggrijp MA, Santman-Berends IMGA, Heuvelink AE, Buter GJ, van Schaik G, Hage JJ et al. Prevalence and risk factors for extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing *Escherichia coli* in dairy farms. *J Dairy Sci.* 2016;99(11):9001–13.
- Grimm V, Ezaki S, Susa M, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3766–74.
- Hall BG, Barlow M. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat.* 2004;7(2):111–23.
- Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(6):1050–1.
- Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(8):1637–44.
- Hille K, Felski M, Ruddat I, Woydt J, Schmid A, Friese A et al. Association of farm-related factors with characteristics profiles of extended-spectrum β -lactamase- / plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from German livestock farms. *Vet Microbiol.* 2018;223:93–9.
- Hille K, Fischer J, Falgenhauer L, Sharp H, Brenner GM, Kadlec K et al. Zum Vorkommen von Extended-Spektrum- und AmpC-Beta-Laktamase-produzierenden *Escherichia coli*

- in Nutztierbeständen: Ergebnisse ausgewählter europäischer Studien. Berl und Münch Tierärztl Wochenschr. 2014;127(9/10):403–11.
- Hommerich K, Ruddat I, Hartmann M, Werner N, Käsbohrer A, Kreienbrock L. Monitoring Antibiotic Usage in German Dairy and Beef Cattle Farms-A Longitudinal Analysis. Front Vet Sci. 2019;6:244.
- Hyde RM, Remnant JG, Bradley AJ, Breen JE, Hudson CD, Davies PL et al. Quantitative analysis of antimicrobial use on British dairy farms. Vet Rec. 2017;181(25):683.
- Ibrahim DR, Dodd CER, Stekel DJ, Ramsden SJ, Hobman JL. Multidrug resistant, extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm. FEMS Microbiol Ecol. 2016;92(4):fiw013.
- Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. In: Tolmasky M, Alonso JC, Hrsg. Plasmids: Biology and impact in biotechnology and discovery. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 475–503.
- Jaurin B, Grundstrom T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. Proceedings of the National Academy of Sciences; 1981; 78(8):4897–901.
- Kaesbohrer A, Bakran-Lebl K, Irrgang A, Fischer J, Kämpf P, Schiffmann A et al. Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing *E. coli* in food in Germany. Vet Microbiol. 2019;233:52–60.
- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of Plasmid-Coded Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 1985;28(2):302–7.
- Köck R, Cuny C. Multiresistente Erreger bei Tier und Mensch. Med Klin Intensivmed Notfmed. 2018;15(3):189-197
- Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2012; 55(10):1311–54.
- Li X-Z, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L. beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. Vet Microbiol. 2007;121(3-4):197–214.
- Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. Front Microbiol. 2016;7:1374.

- Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):557–84.
- Livermore DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:3–10.
- Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(3):179–94.
- Massova I, Mobashery S. Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(1):1–17.
- Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Plasmid-Mediated β -Lactamase from *Escherichia coli* That Inactivates Oxyimino-Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(8):1243–6.
- Mc Dermott PF, Walker RD, White DG. Antimicrobials: Modes of Action and Mechanisms of Resistance. *Int J Toxicol.* 2003;22:135–43.
- Merle R, Busse M, Rechter G, Meer U. Regionalisierung Deutschlands anhand landwirtschaftlicher Strukturdaten. Regionalisation of Germany by data of agricultural structures. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2012;8(1-2):52–9.
- Michael GB, Kaspar H, Siqueira AK, Freitas Costa E de, Corbellini LG, Kadlec K et al. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates collected from diseased food-producing animals in the GERM-Vet monitoring program 2008-2014. *Vet Microbiol.* 2017;200:142–50.
- Montso KP, Dlamini SB, Kumar A, Ateba CN, Garcia-Perdomo HA. Antimicrobial Resistance Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Cattle Farms and Raw Beef in North-West Province, South Africa. *Biomed Res Int.* 2019;2019:4318306.
- Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 2016; 4(2).
- Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(5):962–9.
- Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 1987; 84(21):7378–82.

- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657–86.
- Pfeifer Y, Eller C, Leistner R, Valenza G, Nickel S, Guerra B et al. ESBL-Bildner als Infektionserreger beim Menschen und die Frage nach dem zoonotischen Reservoir. *Hygiene&Medizin.* 2013;38(7/8):294–9.
- Pitton JS. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. In: *Ergebnisse der Physiologie Reviews of Physiology, Volume 65: Springer; 1972. p. 15–93.*
- Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, Schink A-K, Kieffer N, Nordmann P et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2018;6(4).
- Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and Biochemical Characterization of VEB-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase Encoded by an *Escherichia coli* Integron Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(3):573–81.
- Potschka H, Richter A, Kroker R. Pharmaka zur Behandlung bakterieller Infektionen. In: Löscher W, Richter A, Potschka H, Hrsg. *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014. p. 282–330.
- Prescott JF. Beta-lactam Antibiotics: Penam Penicillins. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, Hrsg. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2013a. p. 133–52.
- Prescott JF. Other Beta-lactam Antibiotics: Beta-lactamase Inhibitors, Carbapenems, and Monobactams. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, Hrsg. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2013b. p. 175–87.
- Reist M, Geser N, Hächler H, Schärner S, Stephan R. ESBL-producing *Enterobacteriaceae*: occurrence, risk factors for fecal carriage and strain traits in the Swiss slaughter cattle population younger than 2 years sampled at abattoir level. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e71725.
- Richter A, Löscher W, Hrsg. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.* 4., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2016.
- Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio ML, Galleni M et al. Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* Chromosomal Gene (blaACME) Encoding an Extended-Spectrum Class A β -Lactamase Related to the *Bacteroides* Cephalosporinases and the VEB-1 and PER β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(9):2193–9.

- Santman-Berends IMGA, Gonggrijp MA, Hage JJ, Heuvelink AE, Velthuis A, Lam TJGM et al. Prevalence and risk factors for extended-spectrum β -lactamase or AmpC-producing *Escherichia coli* in organic dairy herds in the Netherlands. *J Dairy Sci.* 2017;100(1):562–71.
- Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(9):3027–32.
- Schmidt O. Genetik und Molekularbiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2017.
- Schwarz S, Cloeckaert A, Roberts MC. Mechanisms and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. In: Aarestrup FM, Hrsg. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, D.C: ASM Press; 2006. p. 73–99.
- Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 10., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2015.
- Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R et al. TLA-1: a New Plasmid-Mediated Extended-Spectrum beta -Lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(4):997–1003.
- Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 1987;20:323–34.
- Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-Mediated Resistance to Third-Generation Cephalosporins Caused by Point Mutations in TEM-Type Penicillinase Genes. *Clin Infect Dis.* 1988;10(4):879–84.
- Tetens JL, Billerbeck S, Schwenker JA, Hölzel CS. Short communication: Selection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in dairy calves associated with antibiotic dry cow therapy-A cohort study. *J Dairy Sci.* 2019;102(12):11449–52.
- Theuretzbacher U. β -Lactamasen: Ein Gegner, der nicht besiegt werden kann. *Pharm. Unserer Zeit.* 2006;35(5):416–21.
- Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(9):711–21.
- Tzouveleakis LS, Bonomo RA. SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999;5(11):847–64.

- Umair M, Mohsin M, Ali Q, Qamar MU, Raza S, Ali A et al. Prevalence and Genetic Relatedness of Extended Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Among Humans, Cattle, and Poultry in Pakistan. *Microb Drug Resist.* 2019;25(9):1374–81.
- Vahaboglu H, Hall LM, Mulazimoglu L, Dodanli S, Yildirim I, Livermore DM. Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. *J Med Microbiol.* 1995;43(4):294–9.
- Vahaboglu H, Oztürk R, Aygün G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(10):2265–9.
- Valat C, Auvray F, Forest K, Métayer V, Gay E, Peytavin de Garam C et al. Phylogenetic grouping and virulence potential of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(13):4677–82.
- Valentin L, Sharp H, Hille K, Seibt U, Fischer J, Pfeifer Y et al. Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(7):805–16.
- Valentin-Weigand P. Antimikrobielle Wirkstoffe. In: Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 10., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2015. p. 134–8.
- van Rennings L, Münchhausen C von, Hartmann M, Otilie H, Honscha W, Käsbohrer A et al. Antibiotikaverbrauch und antibiotikaverkauf in Deutschland im Jahr 2011-zur situation des arzneimittleinsatzes in der Veterinärmedizin. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2014;127:366–74.
- Watson E, Jeckel S, Snow L, Stubbs R, Teale C, Wearing H et al. Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase *E. coli* (CTX-M-15) on a commercial dairy farm. *Vet Microbiol.* 2012;154(3-4):339–46.
- WHO. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance; 2015 [Stand: 2019 Aug 7]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
- WHO. Critically important antimicrobials for human medicine; 2017 [Stand: 2019 Okt 7].

- Wintersdorff CJH von, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol.* 2016;7:173.
- Wolfensberger A, Kuster SP, Marchesi M, Zbinden R, Hombach M. The effect of varying multidrug-resistance (MDR) definitions on rates of MDR gram-negative rods. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8:193.
- Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(3):175–86.

8 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich die Gelegenheit nutzen und allen ganz herzlich danken, die mich bei der Durchführung der Studie und der Niederschrift der Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Für die Bereitstellung des Themas und die exzellente wissenschaftliche Betreuung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen sowie bei Frau Dr. Stephanie Speck bedanken. Frau Dr. Speck hatte immer ein offenes Ohr für die kleinen und die großen Probleme und meist auch direkt eine Lösung parat – oder zumindest beruhigende Worte, bis eine Lösung gefunden war. Prof. Truyen möchte ich ganz besonders für seinen unermüdlichen Einsatz in der Endphase danken, trotz Lockdown oder Wochenende. Vielen Dank an Herrn Dr. Thilo Hackl von der Landesuntersuchungsanstalt Sachsen für die Durchführung der zusätzlichen Resistenztests, sowie an Frau Dr. Yvonne Pfeifer vom Robert-Koch-Institut und Herrn Dr. Jens Hammerl vom Bundesinstitut für Risikobewertung für die Bereitstellung der Positivproben.

Ich bedanke mich herzlich bei unseren Projektpartnern Herrn Prof. Dr. Alexander Starke und Frau Dr. Fanny Rachidi aus der Klinik für Kleintiere, Prof. Dr. Walther Honscha und Uwe Seibt vom Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der VMF Leipzig, sowie Frau Dr. Evelin Ullrich vom Sächsischen Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt Mario Reinhardt, Dana Rüster und Evelin Brumme für die tatkräftige Unterstützung in den Betrieben und im Labor. Auch den anderen DoktorandInnen am Institut kann ich nicht genug danken. Wir haben uns immer gegenseitig geholfen und angefeuert und uns mit gemeinsamen Koch- und Backaktionen in „Krisenzeiten“ abgelenkt. Ohne euch wäre ich sicher nicht bis hierher gelangt!

Und schließlich muss und möchte ich mich natürlich bei meiner Familie bedanken. Sowohl meinen Eltern, die das Auf und Ab während dieser Zeit klaglos hingenommen haben und mich immer unterstützt haben. Wie auch meiner „Hirsch-Familie“ Hanna Fürst, Sophia Körner und Rebecca Großmann mit Basti, Daniel und Tino. Ich bin so dankbar, euch in den ersten Studiumstagen kennengelernt zu haben und euch mittlerweile zur Familie zählen zu dürfen. Ohne euch hätte diese Reise nicht mal halb so viel Spaß gemacht!