

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Departmentleiter: Univ.Prof. Dr.med.vet. Martin Wagner)

Universitätsklinik für Schweine
(Leiterin: Univ.Prof. Dr.med.vet. Andrea Ladinig, Dipl.ECPHM)

**Untersuchungen zur Verbreitung von Colistinresistenzen bei
Escherichia coli in österreichischen Ferkelproduktionsbetrieben**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Viktoria Lex

Wien, im November 2023

Betreuer: Dr.med.vet. Lukas Schwarz
Universitätsklinik für Schweine
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin
Veterinärmedizinische Universität Wien

Co-Betreuer: Priv.-Doz. Dr.med.vet. Igor Loncaric
Institut für Mikrobiologie
Department für Pathobiologie
Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachterin: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Sonja Franz

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

St. Marein bei Graz, den 28.11.2023

Viktoria Lex

KURZFASSUNG

Der erstmalige Nachweis des Resistenzgens *mcr-1* im Kommensalkiem *Escherichia coli* (*E. coli*) tierischen Ursprungs im Jahr 2015 in China lieferte den Beweis für eine Plasmid-vermittelte Colistinresistenz und begründete somit das wissenschaftliche Interesse an Colistinresistenzen. Dieses besorgniserregende Problem der horizontalen Resistenzübertragung steht seither im Fokus weltweiter Forschungsarbeiten. Der hohe Colistineinsatz in der Nutztierhaltung räumt der Frage nach der aktuellen Resistenzsituation große Bedeutung für die globale Gesundheit ein. Nicht zuletzt, da Colistin in der Humanmedizin als Reserveantibiotikum angewandt wird und somit eine herausragende Position innerhalb des globalen Gesundheitskonzepts, auch als One-Health Ansatz bezeichnet, einnimmt. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden erstmalig systematisch Untersuchungen zum Auftreten der *mcr-1* vermittelten Colistinresistenz in österreichischen Ferkelproduktionsbetrieben durchgeführt. Für die Evaluierung der aktuellen Prävalenz der Plasmid-vermittelten Colistinresistenz wurden 100 Stiefeltupferproben in österreichischen Ferkelproduktionsbetrieben gesammelt, *E. coli* aus diesen isoliert und nachfolgend auf die Existenz des *mcr-1* Gens untersucht. Hierfür wurde mittels Mikrodilutionsmethode die Empfindlichkeit der Probenisolate gegenüber Colistin ermittelt. Jene Isolate, die sich als unempfindlich erwiesen, wurden mit Hilfe von PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und anschließender Elektrophorese auf das Vorkommen des *mcr-1* Gens untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse liefern eine erste Einschätzung der Resistenzlage in Österreich und dienen als Vergleichswerte für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Verbreitung des *mcr-1* Gens.

ABSTRACT

The first description of the *mcr-1* mobilized resistance gene in commensal *Escherichia coli* (*E. coli*) of animal origin in late 2015 in China, which provided the first evidence of a plasmid-mediated colistin resistance, endowed wide scientific interest. Since that concerning discovery, the problem of horizontal transmission of resistance, has been researched and discussed worldwide. In human medicine, colistin is declared and used as an antibiotic of last resort and therefore holds an outstanding position in the global health concept. On this account and due to the high consumption of colistin in livestock production, the knowledge about the current resistance situation is of great interest for the maintenance of public health. In this study, the occurrence of *mcr-1* mediated colistin resistance in Austrian piglet production farms was systematically investigated for the first time. To evaluate the current prevalence of plasmid-mediated colistin resistance, 100 boot sock samples were collected from Austrian piglet production farms, phenotypically colistin-resistant bacteria were isolated and subsequently analyzed for the presence of the *mcr*-genes. On this purpose, the sensitivity of the isolates to colistin was determined using the microdilution method. Subsequently, those isolates that proved to be insensitive were examined for the presence of the *mcr*-genes using PCR (polymerase chain reaction) and subsequent electrophoresis. The results obtained provide an initial assessment of the resistance situation in Austria and are intended to serve as comparative values for further investigations of the distribution of the *mcr*-genes in bacteria.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Absetzdurchfall.....	4
2.1	Escherichia coli.....	6
2.1.1	Pathogene <i>Escherichia coli</i>	7
3	Polymyxine.....	8
3.1	Allgemeine Charakteristika und Wirkungsmechanismen der Polymyxine.....	8
3.1.1	Pharmakodynamik.....	8
3.1.1.1	Wirkungstyp.....	8
3.1.1.2	Wirkungsmechanismus.....	9
3.1.1.3	Wirkungspotenz und Wirkungsspektrum.....	10
3.1.2	Pharmakokinetik.....	11
3.1.3	Indikation und Dosierung.....	11
3.1.4	Nebenwirkung und Wartezeit.....	12
3.1.5	Resistenzen gegen Polypeptid-Antibiotika.....	13
3.2	Antibiotikaresistenzen.....	13
3.2.1	Grundlagen der Antibiotikaresistenzen.....	13
3.2.1.1	Natürliche und erworbene Resistenzmechanismen.....	13
3.2.1.2	Chromosomal- und Plasmid-vermittelte Resistenzmechanismen.....	15
3.2.1.3	Entdeckung, Verwandte und Lokalisation des mcr-1 Gens.....	18
3.2.1.4	Strategien gegen Colistinresistenz.....	20
3.2.1.5	Colistinresistenz und Colistinverbrauch in Österreich.....	21
3.2.1.6	Colistinresistenzen und Colistinverbrauch: Situation in der Europäischen Union	24
3.3	Grenzwerte.....	34
4	Material und Methoden.....	36

4.1	Projektbeschreibung	36
4.2	Versuchsdurchführung.....	36
4.2.1	<i>Im Vorfeld durchgeführte Untersuchungen</i>	36
4.2.1.1	Probensammlung, Aufbewahrung und Selektion	36
4.2.1.2	DNA-Extraktion.....	37
4.2.2	<i>Eigens durchgeführte Untersuchungen</i>	37
4.2.3	Anzuchtbedingungen	38
4.2.4	Empfindlichkeitsprüfung.....	38
4.2.4.1	Bouillon-Mikrodilutionsmethode	38
4.2.5	Elektrophorese	39
5	Ergebnisse.....	40
5.1.1	Agardiskdiffusionsmethode	40
5.1.2	Bouillon-Mikrodilutionsmethode	40
5.1.3	PCR.....	40
6	Diskussion	41
7	LITERATUR.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8	Abbildungsverzeichnis	55
9	Tabellenverzeichnis	56

Abkürzungsverzeichnis

AEMPS.....	Spanish Agency of Medicines and Medical Products
AGES.....	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
AMEG.....	Antimicrobial Advice ad hoc Expert Group
BMSGPK.....	Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz
CLSI.....	Clinical and Laboratory Standards Institute
DDD.....	Defined Daily Doses
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
E. coli.....	Escherichia coli
EAEC.....	Enteraggregative E. coli
ECDC.....	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA.....	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EHEC.....	Enterohämorrhagische E. coli
EIEC.....	Enteroinvasive E. coli
EMA.....	Europäischer Arzneimittelbehörde
EMB.....	Eosin-Methylen-Blau-Agar
EPEC.....	Enteropathogene E. coli
ESBL.....	Extended-Spectrum-Betalaktamasen
ESCMID.....	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ETEC.....	Enterotoxische E. coli
EUCAST.....	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HNO.....	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
HPCIA.....	highest priority critically important antimicrobials
L-Ara4N.....	4-deoxy-L-Arabinose
LPS.....	Lipopolysaccharide
MHK.....	minimale Hemmkonzentration
MRGN.....	multiresistente gramnegative Erreger
NAC.....	European National Breakpoint Committee
NDM-1.....	Neu-Delhi Metallo-Beta-Laktamase
ORF.....	open reading frame
PCR.....	Polymerasenkettenreaktion
PEtn.....	Phosphoethanolamin

PCU.....Population Correction Unit
PDR.....Pandrug-Resistance
PWD..... post weaning diarrhoea
qPCR.....quantitative Polymerasenkettenreaktion
WHO..... World Health Organization

Einleitung

Aufgrund der voranschreitenden Globalisierung und dem engen Zusammenleben von Mensch und Tier wird der Bedeutung der „One Health“ Strategie immer mehr Wichtigkeit zugeschrieben.

Der vereinheitlichte Ansatz der One Health-Initiative soll die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt gewährleisten und optimieren. Die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt ist eng miteinander verbunden und beeinflusst sich gegenseitig. Veränderungen in einem dieser Bereiche können Auswirkungen in einem anderen bewirken (1).

Um die Erhaltung der globalen Gesundheit zu gewährleisten, müssen gemeinsame Maßnahmen in diesen Sektoren erarbeitet werden, die in der Lage sind, Gesundheitsbedrohungen vorherzusagen und abzuwenden. Um globalen Gesundheitsrisiken Herr zu werden, müssen Konzepte in den Bereichen Ernährungssicherheit, Umweltmanagement, Kontrolle von Zoonosen und Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen erarbeitet werden (2).

Da Antibiotika in unterschiedlichen Bereichen wie Humanmedizin, Veterinärmedizin und Landwirtschaft eingesetzt werden, kann es aufgrund des erhöhten Selektionsdruckes zu Entwicklungen von Antibiotikaresistenzen kommen. Diese Resistenzen kennen keine Grenzen und somit ist die Erhaltung der Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt wiederum voneinander abhängig (2, 3).

In den letzten Jahren häuften sich Berichte über Erreger, deren Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika abgeschwächt waren oder gar verloren gingen. Antibiotikaresistenzen haben Wirkungsverluste im Sinne einer Unempfindlichkeit gegenüber Bakterien zur Konsequenz, was wiederum die Wichtigkeit sogenannter Reserveantibiotika hervorhebt. Als Reserveantibiotika werden jene antibakteriell wirksamen Substanzen bezeichnet, die als letztmögliche Therapie gegen multiresistente Bakterien Anwendung finden. Aufgrund dessen ist ihre Bedeutung in der Humanmedizin von großem Stellenwert (4).

Um Resistenzentwicklungen innerhalb der Kategorie der Reserveantibiotika zu vermeiden, werden diese ausschließlich mit strenger Indikation eingesetzt. Mittels dieser gezielten Anwendung wird versucht die Resistenzentwicklung gering zu halten.

Das Polypeptid-Antibiotikum Colistin, ist als solches Reserveantibiotikum deklariert und zählt für die WHO (World Health Organisation) zu den für die Humanmedizin wichtigsten kritischen Antibiotika mit höchster Priorität. Es wird in der Humanmedizin bei schwerwiegenden Infektionen mit Carbapenem-resistenten und multiresistenten gramnegativen Keimen eingesetzt, bei denen kein anderes Antibiotikum wirksam ist (5).

In der Veterinärmedizin kommt Colistin nach wie vor häufig zur Anwendung, wie etwa bei Darminfektionen von Schweinen, Geflügel und Rindern. In Österreich belegte 2020 die Wirkstoffgruppe der Polymyxine, zu deren Hauptvertreter Colistin zählt, den sechsten Platz hinsichtlich der Abgabemenge mit einer Vertriebsmenge von 1,47 Tonnen in der Veterinärbranche (6).

Innerhalb der Schweineproduktion stellen Durchfallerkrankungen die häufigste Ursache für wirtschaftliche Verluste dar. Neben Colistin werden Zinkoxid-haltige Tierarzneimittel zur Behandlung von Absetzdurchfall eingesetzt. Der therapeutische Einsatz von Zinkoxid hat allerdings negative Auswirkungen auf die Umwelt zur Folge und resultiert außerdem in einem erhöhten Auftreten von Antibiotikaresistenzen. Aufgrund dessen wurde das mit 26. Juni 2022 in Kraft getretene EU-weite Verbot der Verwendung von Zinkoxid-haltigen Tierarzneimitteln erlassen. Durch den Verlust dieser Tierarzneimittel bleiben den Landwirten nur noch wenige Alternativen zur Behandlung von Absetzdurchfall. Angesichts der mangelnden Anzahl der zur erfolgreichen Therapie verfügbaren Antibiotikawirkstoffgruppen ist wiederum mit einem erhöhten Einsatz von Colistin zu rechnen (7, 8). Um dem Bestreben nach Reduktion des Antibiotika-Einsatzes nachzukommen und bis praktikable Alternativen entwickelt wurden, ist es umso wichtiger Strategien und Maßnahmen in Bereichen der Betriebsführung und Biosicherheit zu erarbeiten und zu ergreifen, um dem Auftreten des Absetzdurchfalles vorzubeugen (7).

Mit der Entdeckung des Plasmid-vermittelten bakteriellen Resistenzgens *mcr-1* in China, wurde die Debatte um den Einsatz von Reserveantibiotika in der Veterinärbranche erneut angeheizt. Dieses Gen macht Bakterien unempfindlich gegenüber Colistin (5). Die Tatsache, dass dieses Gen sich nicht in der chromosomalen-DNA (Desoxyribonukleinsäure) der Bakterien befindet, sondern in Plasmiden auftritt, birgt große Gefahren. Plasmide können durch horizontalen Gentransfer weitergegeben werden und somit nicht nur rasch, sondern auch auf andere Bakterienstämme und somit speziesübergreifend verbreitet werden. So können Colistinresistenzen innerhalb kürzester Zeit auch auf jene Individuen übertragen

werden, die mit diesem Antibiotikum nicht behandelt wurden und es stellt sich unwiderruflich die Frage nach der bestehenden Wirksamkeit des Reserveantibiotikums Colistin. Durch die Entdeckung dieses Plasmid-vermittelten Resistenzgens wurden international zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich des Auftretens und der Verbreitung des *mcr-1* Gens vorgenommen (5, 6, 9).

Um die Situation der Colistinresistenz in der österreichischen Schweineproduktion einschätzen und mit anderen Ländern vergleichen zu können, wurde innerhalb dieser Arbeit das Auftreten von phäno- sowie genotypisch nachweisbaren Colistinresistenzen innerhalb der Gattung *Escherichia (E.) coli* untersucht.

Die Hypothese lautet, dass trotz breitflächigem Einsatz von colistinhaltigen Arzneimitteln in der Schweineproduktion, das Auftreten von colistinresistenten *E. coli* gering ist und eine Prävalenz von unter 10% aufweist.

2 Absetzdurchfall

Die Zeit des Absetzens von Saugferkeln ist eine einschneidende Phase der Aufzucht. Zeitgleich hat das Ferkel, welches zu diesem Altersabschnitt ohnehin durch die in diesem Alter schwindenden Immunglobuline in der Muttermilch mit einem unausgereiften Immunsystem zu kämpfen, welches nun durch die Einstallung in eine neue Gruppe zusätzlich durch neue Umgebungskeime gefordert wird. Somit müssen diverse Vorkehrungen und Maßnahmen getroffen werden, um jene Umweltfaktoren, die den Komplex des Absetzdurchfalls begünstigen, zu minimieren. Hierbei spielen vor allem Stress durch die Eingliederung in eine neue Gruppe sowie der Verlust der Muttersau, ein geschwächtes Immunsystem und die Futterumstellung auf feste Nahrung eine entscheidende Rolle. In dieser Altersperiode sind Schweine besonders anfällig für viele unterschiedliche Erreger, die eine Durchfallerkrankung zur Folge haben können. Große Bedeutung kommt dem Erreger *E. coli* aus der Familie der *Enterobacteriaceae* zu. Er ist hauptverantwortlich für den Absetzdurchfall. Aber auch andere Bakterien wie *Lawsonia intracellularis* und *Salmonella enterica* besitzen einen maßgeblichen Einfluss auf die Gesundheit des Magen-Darm-Traktes der Absetzferkel. Corona- und Rotaviren stellen virale Erreger der Durchfallerkrankung dar (10, 11).

Die Zustände, die mit dem Auftreten des Absatzdurchfalls einhergehen, werden auch unter dem Symptomkomplex „post weaning diarrhea“ (PWD) zusammengefasst. PWD ist eine der am häufigsten vorkommenden Erkrankungen in der Ferkelaufzucht. Verbunden ist das Auftreten des Symptomkomplexes des Absetzdurchfalls mit der Proliferation von enterotoxischen *E. coli* (ETEC) innerhalb des Magendarmtraktes der Schweine. ETEC zeigt sich als Kommensale der physiologischen Darmflora des Dickdarmes im Gastrointestinaltrakt. Innerhalb der Dünndarmflora jedoch vermag ETEC sich nach fäkal-oraler Aufnahme über spezifische Fimbrien an den Enterozyten der Dünndarmschleimhaut anzuheften. Der bakteriellen Kolonisation des Dünndarms folgen die Bildung und Sezernierung von Endotoxinen. In weiterer Folge kommt es zur Ausbildung einer sekretorischen Diarrhoe und dahingehend zu Elektrolytmangel mit darauffolgender Exsikkose. Die klinische Symptomatik wird weiters von Durchfall, Dehydration, Abmagerung, Wachstumsverzögerung, metabolischer Azidose oder seltener von perakutem Versterben der Tiere begleitet. Auch können die Absetzferkel von Herz-Kreislaufversagen oder einem Endotoxinschock betroffen sein (11, 12).

Ein weltweites Problem darstellend, tritt es vorwiegend in den ersten beiden Wochen nach dem Absetzen auf. Gewöhnlich werden die Ferkel mit einem noch relativ jungen Alter von 28 Tagen abgesetzt. In diesem Alter unterschreitet der Antikörper-Antigen-Spiegel eine kritische Schwelle. Dies ist vorwiegend dann der Fall, wenn die Antikörpermenge in der Muttermilch rapide absinkt und die Ferkel zur selben Zeit noch keine vollständig ausgereifte Immunität aufweisen, der Erregerdruck jedoch kritisch wird (11).

Die mit PWD einhergehende Mortalitätsrate beträgt 1,25-2%, bei Nichtbehandlung bis zu 25%. Während akuter Ausbrüche von PWD kann die Mortalität der erkrankten Schweine 20-30% über eine Zeitspanne von ein- bis zwei Monaten betragen (12, 13). Um das Auftreten von Absatzdurchfall einzuschränken, wird in der Tierschutzgesetzgebung empfohlen, Ferkel nicht vor einem Alter von 28 Tagen abzusetzen. Studien hierzu bestätigen die Verringerung des Auftretens bei einem Absatzalter von über 26 Tagen (13). Das Management hinter dem erfolgreichen Absetzen beginnt bereits zuvor, während der Säugeperiode. Im Laufe des Absetzens werden die Ferkel auch mit zahlreichen neuen Krankheitserregern konfrontiert, weswegen ein hoher Hygienestandard anzustreben ist. Biosecurity-Maßnahmen sowie ein konsequentes Rein-Raus-System tragen dazu bei, die Keimbelastung möglichst gering zu halten (7). Zusätzlich spielen zahllose weitere Kriterien des Betriebsmanagements, wie bauliche sowie klimabedingte Faktoren, eine große Rolle in Bezug auf Gesundheitszustand und Tierwohl (14).

Die ausreichende Aufnahme der Biestmilch und die Vermeidung von Saugferkeldurchfall helfen den Schweinen, gestärkt in die Absatzperiode überzugehen. Daher ist es wichtig, die Darmgesundheit zu fördern und die Mikroflora durch hochwertige Prästarter und Ferkelaufzuchtfutter, Probiotika, Präbiotika und die Supplementierung von organischen Säuren zu stärken. Auch sollte ein Futteraufnahmeloch, sowie das Risiko des Überfressens vermieden werden. Futterumstellungen sollten nie abrupt, sondern langsam und schrittweise erfolgen und es ist auf einen reduzierten Rohproteingehalt sowie einen ausreichend hohen Fasergehalt zu achten. Der Stressfaktor sollte möglichst minimiert werden, dass durch Maßnahmen gegen Überbelegung, ein angepasstes Tier-Fressplatz-Verhältnis oder auch ausreichend Beschäftigungsmaterial erfolgen kann (15, 16).

Therapiert werden die von *E. coli* ausgelösten Infektionen des Darmtraktes, insbesondere in Zusammenhang mit PWD, am häufigsten durch die orale Gabe des Antibiotikums Colistin, da die Monotherapie mit dieser antimikrobiell wirkenden Substanz nicht nur gute Erfolge aufweist, sondern auch kostengünstig ist. Seltener werden auch Aminoglykoside angewandt. Erkrankte Ferkel werden parenteral behandelt, Tiere derselben Gruppe, die noch keine Krankheitssymptomatik zeigen werden meist metaphylaktisch über die Futter- und Wassergaben therapiert. Weiters muss auf die Rehydratation samt der Behebung des Elektrolytmangels geachtet werden (11–13).

2.1 *Escherichia coli*

Erstmals wurde *E. coli* 1885 von Theodor Escherich, welcher später auch als Namensgeber des Organismus diente, als darmspezifisches Bakterium beschrieben (17). *E. coli* gehört der Familie der *Enterobacteriaceae* an. Zu dieser zählen derzeit etwa 60 verschiedene Gattungen mit hunderten von Arten. *E. coli* gilt als der am besten erforschte Organismus. Dadurch hat sich auch die Taxonomie dieser Gattung in den letzten Jahrzehnten mehrmals geändert und darf auch heute immer noch nicht als abgeschlossen betrachtet werden (18).

Enterobacteriaceae sind gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchen. Sie stellen sich als plumpe, mit abgerundeten Enden und Kapsel aufweisende Stäbchen mit einer Dicke von 0,15-1,5 μm und einer Länge von 2-4 μm dar (18). *E. coli* ist meist begeißelt und kann sich durch H-Antigene, die Flagellenantigene, fortbewegen (18, 19).

Bakterien zählen zu den Prokaryoten und ihr Zellaufbau unterscheidet sich von jenem der Eukaryonten. Die Bakterienzellen besitzen keine Zellorganellen wie ein endoplasmatisches Retikulum, einen Golgi-Apparat, Mitochondrien oder einen Zellkern und besitzen im Gegensatz zu den Eukaryoten kein kompartimentalisiertes Zellinneres. Das Erbgut liegt als ringförmiges Chromosomenäquivalent frei im Zellinneren und da dieses länger als das Bakterium ist, wird sie durch Gyrasen verdrillt. Ebenso kann das Erbgut in kleineren Einheiten vorliegen. Diese ringförmig angeordneten extrachromosomalen DNA-Stücke werden als Plasmide bezeichnet und enthalten oft Gene, die Resistenzen vermitteln (20).

2.1.1 Pathogene *Escherichia coli*

E. coli ist in der Lage, sowohl intestinal als auch extraintestinal, also in Regionen, die außerhalb des Darmtraktes liegen, Infektionen hervorzurufen. Intestinale Erkrankungen werden stets exogen hervorgerufen, extraintestinale dahingegen meist endogen. Hinsichtlich des pathogenen Vermögens von *E. coli* werden drei Gruppen unterschieden: apathogene *E. coli*, fakultativ pathogene sowie obligat pathogene *E. coli*. Zur physiologischen Flora des Darmes bei Warmblütern zählen Stämme der apathogenen sowie fakultativ pathogenen Keime. Fakultativ pathogene Stämme verursachen eine Reihe unspezifischer Krankheitsbilder, sofern die Situation im Makroorganismus für sie opportun ist (19, 21).

Die obligat pathogenen *E. coli*-Stämme gehören nicht zur physiologischen Darmflora und können Enteritiden und nach Ausbreitung auch systemische Erkrankungen auslösen. So können diese Stämme leichte bis schwere Durchfallerkrankungen verursachen und anhand ihrer unterschiedlichen Virulenz-assoziierten Faktoren in fünf Pathotypen unterteilt werden. Die Krankheitsentwicklung ist abhängig von verschiedenen Pathogenitätsfaktoren, deren Kombination auch ausschlaggebend für die Klinik sein kann. Diese kommen als Adhäsine, die die Bindung an epitheliale Oberflächen ermöglichen, oder auch als sezernierte Toxine vor (18, 19).

Die verschiedenen Krankheitsbilder verursacht durch obligat pathogene *E. coli* werden folgendermaßen eingeteilt: Enteropathogene *E. coli* (EPEC), Enterotoxische *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) und Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (18, 19, 22). Sie alle besitzen das Vermögen, als Erreger von Darminfektionen und Durchfallerkrankungen in unterschiedlichen Altersklassen zu fungieren (22).

3 Polymyxine

3.1 Allgemeine Charakteristika und Wirkungsmechanismen der Polymyxine

Zu den Polypeptid-Antibiotika gehören die Gruppe der Polymyxine sowie Bacitracin. Colistin, das auch als Polymyxin E bezeichnet wird, zählt zusammen mit Polymyxin A, Polymyxin B, Polymyxin C sowie Polymyxin D zu den Polymyxinen. Von ihnen werden jedoch nur Polymyxin B sowie Colistin klinisch angewandt. Diese Polymyxine sind zyklische Dekapeptide, die durch endständige Fettsäurereste amphotere Eigenschaften besitzen. Bacitracin hingegen fehlt der Fettsäurerest. Diese Abweichung der chemischen Struktur resultiert in unterschiedlichen Wirkungsspektren der Polymyxine und Bacitracin. Während Polymyxine vorwiegend gegen gramnegative Bakterien wirksam sind, ist Bacitracin gegen grampositive Bakterien im Einsatz (23–25).

3.1.1 Pharmakodynamik

Die Pharmakodynamik ist ein wichtiges Teilgebiet der Pharmakologie und umfasst die Lehre der Wirkung eines Arzneimittels in einem Organismus, die Dosis-Wirkungsbeziehung sowie die Wechselwirkungen mit anderen Molekülen (23).

3.1.1.1 Wirkungstyp

Der Wirkungstyp eines Antibiotikums beschreibt dessen bakterizid beziehungsweise bakteriostatisch agierenden Charakter durch Angriff auf bakterielle Strukturen und ist somit ein wichtiges Auswahlkriterium (23).

Bei der Auswahl des geeigneten Antibiotikums sind diverse Fragen zu klären. Es wird nach dem Leitsatz "Der Wirkungsmechanismus bestimmt das Wirkungsspektrum" vorgegangen. Antibiotika können bakterizid oder bakteriostatisch wirken. Bakterizid wirkende Antibiotika töten die Bakterien ab, wohingegen bakteriostatisch wirkende Antibiotika das Keimwachstum

reversibel hemmen. Jene bakterizid wirkenden Antibiotika können in konzentrationsabhängige sowie in zeitabhängige Bakterizide unterteilt werden. Zu den konzentrationsabhängigen Bakteriziden zählen zum Beispiel Polymyxine, Aminoglykoside und Gyrasehemmer. Bei diesen ist die Konzentration für den Wirkungserfolg entscheidend. Sie sind in der Lage, sofern eine ausreichend hohe Konzentration vorliegt, auch nichtproliferierende Keime zu töten. β -Lactam-Antibiotika gehören zu den zeitabhängigen Bakteriziden. Ihr Wirkungserfolg ist zeitabhängig, da sie nur schlecht gegen nichtproliferierende Zellen wirken (20, 23).

3.1.1.2 Wirkungsmechanismus

Antibiotika werden aufgrund ihrer "Angriffspunkte" klassifiziert. Zu diesen zählen die jeweilige Wirkung auf die Oberfläche einer Bakterienzelle, das bakterielle Ribosom und die Enzyme der Nukleinsäuresynthese. Damit antibakteriell wirksame Substanzen ihren Aufgaben nachgehen können, müssen diese zunächst die Barriere in Form der Zellmembran überwinden, um innerhalb der Zielzelle die Hemmkonzentration zu erreichen. Dies wird über zwei verschiedene Wege ermöglicht. Entweder gelangen Antibiotika über den Lipid-vermittelten Weg oder über Diffusionsporine in das Zellinnere (26). Die bakterizide Wirkung wird durch den Angriff auf Zellwand, Zellmembran oder die Nukleinsäuren der Bakterien vermittelt. An der Zellwand greifen β -Lactam-Antibiotika in die Synthese des Peptidoglykangerüsts, das Murein, ein, welches in Säugetierzellen nicht vorhanden ist. Es kommt zum Platzen und zur Lysis der Bakterienzelle. Polymyxine schädigen die Zellmembran direkt, Aminoglykoside indirekt und bewirken damit ebenso die Lyse der Bakterienzellen. Gyrasehemmer wie Fluorchinolone wirken bakterizid, indem sie die Topoisomerase hemmen, die für die DNA-Synthese benötigt wird. Bakteriostatische Wirkungen bewirken eine Störung der Proteinsynthese an den Ribosomen oder an der Folsäuresynthese (23).

Die bakterizide Wirkung von Polymyxinen wird ihnen durch das Einwirken auf die Phospholipidkomponenten der Zellmembran verliehen. Bacitracin hingegen hemmt die bakterielle Murein-Biosynthese (23).

Zu erwähnen ist, dass der exakte Wirkungsmechanismus von Polymyxinen nach wie vor noch nicht vollständig geklärt sein dürfte. Es wird angenommen, dass es zunächst zu einer Störung der Permeabilitätsbarriere der äußeren Membran kommt. Die Polymyxine binden mit ihrem

positiv geladenen α,γ -Diaminobuttersäureresten aufgrund von elektrostatischer Interaktionen an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Lipopolysaccharide (LPS), vorwiegend an Lipid A. Dieses spielt eine wichtige Rolle für die Kontrolle der Membranpermeabilität. Colistin wirkt außerdem auf die membranstabilisierenden Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} , die von den Phosphatgruppen der LPS gebunden sind, als Detergens. Aufgrund dieser Einflüsse wird die dreidimensionale Struktur der LPS verändert. Dadurch erhöht sich die Permeabilität der Zellwand. Der Verlust der Permeabilitätsbarriere der äußeren Membran erlaubt es dem Antibiotikum bis zur inneren Membran vorzudringen und auch auf diese einzuwirken. Somit wirken Colistin und Polymyxin B auf beide Membransysteme gramnegativer Bakterien ein, wodurch es zur Störung der Integrität der Bakterien kommt. Essenzielle Plasmabestandteile sowie der Zytoplasmahalt gehen verloren, was schlussendlich den Zelltod verursacht (27–29).

Polymyxine kennzeichnen sich durch ein hohes Molekulargewicht. Deshalb und aufgrund der Bindung an die Membranproteine von Eukaryontenzellen, passieren sie die Zellbarriere nicht und erfassen somit nur extrazellulär lokalisierte Erreger (23).

3.1.1.3 Wirkungspotenz und Wirkungsspektrum

„Die antibakterielle Wirkungspotenz eines Antibiotikums wird durch die *in vitro* Empfindlichkeit als minimale Hemmkonzentration (MHK) angegeben. Die MHK ist die geringste Konzentration eines Antibiotikums, durch die bestimmte Bakterien *in vitro* im Wachstum gehemmt, beziehungsweise abgetötet werden (23)“.

Das Wirkungsspektrum beinhaltet jene Erregerarten, die das jeweilige Antibiotikum unter Berücksichtigung der MHK erfasst. Anhand des Wirkungsspektrums können Breitspektrum-Antibiotika von Schmalspektrum-Antibiotika differenziert werden. Breitbandantibiotika wirken gegen grampositive, als auch gegen gramnegative Erreger. Schmalbandantibiotika hingegen zeichnen sich durch eine hohe Wirkungspotenz gegenüber bestimmten Keimen aus (23).

3.1.2 Pharmakokinetik

Damit sichergestellt ist, dass die MHK auch ausreichend lange am Infektionsort erhalten bleibt, müssen auch die pharmakokinetischen Eigenschaften miteinbezogen werden. Dazu zählen die Bioverfügbarkeit, das Verteilungsvolumen samt der Gewebegängigkeit, die Eliminationswege und die Eliminationsgeschwindigkeit (23).

Polymyxine sind durch eine Halbwertszeit von vier bis fünf Stunden nach parenteraler Gabe gekennzeichnet. Nach oraler Gabe zeigt sich eine geringe Resorption. Die Gewebefixierung ist hoch und die Ausscheidung erfolgt vorwiegend renal (23).

3.1.3 Indikation und Dosierung

Colistin, das erstmals 1949 in Japan aus *Bacillus polymyxa* isoliert wurde, wurde zunächst in der Human- sowie in der Veterinärmedizin eingesetzt. Aufgrund der schlechten Verträglichkeit basierend auf den neuro- und nephrotoxischen Eigenschaften der Polymyxine sowie der Entwicklung anderer Antibiotika, wie beispielsweise Aminoglykoside, die eine vergleichbare Wirkungsbreite aufweisen, wurde Colistin in der Humanmedizin in der Zeit der 1970er beziehungsweise 1980er nahezu ausrangiert. Systemische Anwendung finden Polymyxine nur selten bei schweren Infektionen mit multiresistenten Keimen. Heute gilt Colistin als eine der letzten therapeutischen Optionen zur Behandlung von Infektionen mit multiresistenten gramnegativen Bakterien (MRGN). Vor allem ist dies bei Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* der Fall und wird deshalb als Reserveantibiotikum bezeichnet. Auch bei nosokomialen Infektionen aufgrund von Carbapenem-resistenten gramnegativen Bakterien kommt es häufig zum Einsatz. Die orale Gabe von Polymyxin B und Colistin findet beispielsweise Anwendung zur Darmdekontamination bei Leukämiepatienten, zur topischen Anwendung finden sie sich in Lokalpräparaten der Dermatologie sowie HNO- und Augenheilkunde wieder. Bei Mukoviszidose-Patienten sowie bei Therapien von Atemwegsinfektionen werden Polymyxine inhalativ eingesetzt. Hierbei können eine Histaminfreisetzung und ein Bronchospasmus als Komplikationen der Therapie auftreten. Bacitracin ist häufig Bestandteil vieler Dermatika in der Humanmedizin (23, 30, 31).

In der Veterinärmedizin hingegen wird Colistin seit jeher vorwiegend bei Enteritiden und zu deren Prophylaxe angewandt. Auch 2021 noch belegt es den sechsten Platz der am meisten abgegebenen Wirkstoffgruppen von Antibiotika bei Nutztieren in Österreich. Grund dafür ist einerseits der Mangel an Alternativen, welche zur Zeit vorwiegend aus ebenso Reserveantibiotika deklarierten antibakteriellen Substanzen bestehen, sowie die gute Verträglichkeit und geringe Wartezeit (32, 33).

Sein Einsatz in der Tiermedizin beschränkt sich vorwiegend auf topische und orale Applikationen. So wird Colistinsulfat bei Darminfektionen mit gramnegativen Keimen oral verabreicht, da es enteral kaum resorbiert wird und dadurch eine akzeptable Verträglichkeit aufweist. Häufig ist das bei Infektionen mit *E. coli* bei Geflügel, Rind und Schwein der Fall. Die parenterale Gabe ist nur bei septikämischen Prozessen mit multiresistenten Keimen wie beispielsweise *E. coli*, Klebsiellen, Pseudomonaden und Salmonellen gerechtfertigt. Die Dosierungen betragen zwischen 2-18 mg/kg bei parenteraler als auch oraler Gabe. Polymyxin B findet vor allem bei lokaler Infektion der Haut, des äußeren Gehörganges und Analbeutelinfektionen beim Kleintier Anwendung. Bei lebensmittelliefernden Tieren ist die Polymyxin B Gabe verboten. Bacitracin findet sich oft in der Therapie von Enterokolitiden verursacht durch *Clostridium perfringens* beim Kaninchen. Sofern eine andere zugelassene wirksame Alternative besteht, ist die Anwendung von Polymyxinen immer kontraindiziert (23, 30, 34).

3.1.4 Nebenwirkung und Wartezeit

Polypeptidantibiotika können neurotoxische und muskelrelaxierende Wirkungen aufweisen, begleitet von Parästhesien, Ataxien und neuromuskulärer Blockaden sowie peripherer Atemlähmung. Auch eine nephrotoxische Komponente wird ihnen zugeschrieben. Aufgrund dessen ist eine Kombination von potenziell neuro- und nephrotoxischer Substanzen sowie die Anwendung bei Patienten mit einer Nierenfunktionsstörung kontraindiziert (23, 27).

Für orale Colistingaben sind Wartezeiten von zwei Tagen auf essbares Gewebe von Schwein, Rind, Kalb und Huhn festgelegt. Bei Eiern beträgt die Wartezeit null Tage. Nach intramuskulärer Gabe ist eine Wartezeit von 20 Tagen auf essbares Gewebe dieser Tiere festgelegt sowie das Verbot dieser Applikationsform bei laktierenden Tieren. Nach

Verabreichung von Bacitracin muss eine Wartezeit von zwei Tagen eingehalten werden. Dieses findet vor allem bei der Haltung von Mastkaninchen Anwendung (23).

3.1.5 Resistenzen gegen Polypeptid-Antibiotika

Die Resistenzrate ist relativ gering bei einem Wert von 2-10% für *E. coli* und vorwiegend chromosomal bedingt. Auch Plasmid-vermittelte Resistenzen sind beschrieben und mehr denn je Bestandteil der Forschung (23–25, 35–43).

3.2 Antibiotikaresistenzen

Um der Selektion von resistenten Bakterien nicht Vorschub zu leisten, ist es wichtig, Antibiotika nur bei medizinischer Notwendigkeit anzuwenden. Dies zeigt die unabdingbare Notwendigkeit auf, jeden Einsatz unter der Forcierung der möglichen eintretenden Resistenzproblematik zu überdenken. Die Reduzierung und Optimierung des Antibiotikaeinsatzes sowie dessen ordnungsgemäße Anwendung hinsichtlich Auswahl, Dosis, Dosisintervall, Applikationsart sowie Behandlungsdauer stellen die wichtigsten Ansatzpunkte zur Vermeidung von Resistenzentwicklungen und daraus resultierendem Therapieversagen dar (23, 44).

3.2.1 Grundlagen der Antibiotikaresistenzen

Resistenz bedeutet die Unempfindlichkeit eines Erregers gegenüber einem Antibiotikum. Diese ist *in vitro* quantitativ messbar durch die minimale Hemmkonzentration. Abhängig ist die MHK vom Wirkstoff, den Bakterien sowie den vorliegenden Resistenzmechanismen, wobei erworbene Resistenzen auch regionalen Schwankungen unterliegen (23).

3.2.1.1 Natürliche und erworbene Resistenzmechanismen

Die natürliche Resistenz beschreibt jene Eigenschaften eines Bakteriums, welche es ohne jegliche äußere Einflussnahme aufgrund seiner Beschaffenheit resistent gegen Antibiotika machen. Antibiotika können aufgrund der intrinsischen Resistenz unwirksam gegenüber einem

Bakterium sein, wenn dem Antibiotikum der Angriffspunkt fehlt. So ist zum Beispiel ein β -Lactam-Antibiotikum bei Infektionen mit Mykoplasmen wirkungslos. Sie hemmen die Zellwandbiosynthese, da Mykoplasmen allerdings keine Zellwände besitzen, ist dieses Antibiotikum unwirksam. Ebenso kann die äußere Lipidmembran bei gramnegativen Bakterien ein Hindernis darstellen, somit kann die antibakteriell wirksame Substanz nicht gut eindringen und ist aufgrund dessen wirkungslos. Schlussendlich besitzen viele Bakterien auch Effluxpumpen, die das Antibiotikum schnell wieder aus der Zelle hinaus befördern (20).

Die Grundlage der Entstehung erworbener Resistenzen ist die Mutation. Einerseits wird die Selektion resistenter Stämme durch Einwirkung eines Antibiotikums, welches die empfindlichen Populationsmitglieder auslöscht, gefördert, andererseits entstehen durch Mutationen oder Übertragung von Resistenzgenen resistente Bakterien (19).

Im Gegensatz zu den natürlichen Resistenzen, stellen die erworbenen Resistenzen ein enormes Problem dar. Erworbene Resistenzen kennzeichnen sich durch den Verlust ihrer Wirksamkeit gegenüber ursprünglich empfindlichen Keimen. Diese stützen sich auf angewandte Resistenzmechanismen, welche man in drei Kategorien einteilen kann:

- „• Veränderung der zellulären Angriffsstellen der Wirkstoffe
- enzymatische Inaktivierung der Wirkstoffe
- verminderte intrazelluläre Akkumulation der Wirkstoffe“ (23).

Grundlage dieser Mechanismen ist der Austausch von genetischer Information. Zu diesen zählen Konjugation, Transduktion, Transformation und die Punktmutation (18, 19, 21).

Sehr rasche Verbreitung findet bei übertragbaren extrachromosomalen Resistenzen statt, die unabhängig von der Zellteilung von einem Bakterium auf ein anderes übergeben wird. Diese beruht auf dem Erwerb von zusätzlicher "extrachromosomaler Erbinformation" in Form von Plasmiden. Neben dem horizontalen Transfer kann so Erbinformation auch vertikal mittels Konjugation an eine Tochterzelle weitergegeben werden. Plasmide sind extrachromosomale, doppelsträngige meist ringförmige DNA-Moleküle, die sich teilungsunabhängig vermehren können. Sie beinhalten DNA-Sequenzen, die unter anderem auch für Pilusproteine kodieren können. Dadurch wird ein Konjugationspilus ausgebildet, der das Anheften an anderen Bakterienzellen ermöglicht. Durch diesen können Plasmide durch Replikation und Transfer der Einzelstrangkopie von der Donatorzelle auf die Rezipientzelle übertragen werden. Plasmide

werden auch als Resistenzfaktoren bezeichnet und spielen eine große Rolle bei der Verbreitung von Multiresistenzen, also einer gleichzeitigen Resistenz gegen drei oder mehr Antibiotika unterschiedlicher Wirkstoffgruppen. Diese Form der Resistenzweitergabe findet vorwiegend zwischen gramnegativen Bakterien statt und kann speziesübergreifend sein. Neben Plasmiden können auch Transposone, also "springende Gene" Träger der Resistenzgene sein (20, 45).

Die Transduktion stellt die phagenvermittelte Resistenz dar. Phagen sind Viren, die Bakterien befallen. Diese sind spezifisch für eine Bakterienart und schleusen DNA-Abschnitte ein, die daraufhin in die chromosomale DNA eingebaut wird. Die Transformation ist die Resistenzentwicklung durch horizontalen Gentransfer. Hierbei wird experimentell DNA in das Bakterium eingebracht. Punktmutationen können schlagartig Resistenzen herbeiführen, indem sie das Zielenzym oder die Zielstruktur des Bakteriums verändern (3, 19, 21).

Beobachtet wurde die Form der erworbenen Resistenz bereits in den 1960er Jahren während der Shigellenepidemie. Viele Keimisolate waren gegenüber Antibiotika, die gar nicht eingesetzt wurden, unempfindlich. In diesem Fall wurde die Resistenz über Plasmide vermittelt (20).

3.2.1.2 Chromosomal- und Plasmid-vermittelte Resistenzmechanismen

Colistinresistenz kann sowohl chromosomal-, als auch Plasmid-vermittelt übertragen werden. Die horizontale Übertragung durch die Konjugation der Plasmide stellt ein herausragendes Risiko im Kampf gegen Antibiotikaresistenzen dar. Die chromosomale Resistenz von *E. coli* gegen Colistin beruht ebenso wie die Plasmid-vermittelte auf einer Änderung der Lipopolysaccharidstrukturen der äußeren Membran, die wiederum Auswirkung auf die Bindung zwischen dem Zielbakterium und dem Antibiotikum hat. Diese Strukturänderungen werden über LPS-modifizierende Enzyme vermittelt. Jene Gene, die für die Biosynthese dieser kodieren, sind Ursprung des Resistenzmechanismus (28).

Veranlasst wird die Strukturänderung aufgrund einer Modifikation des Lipids A durch die Addition einer 4-deoxy-L-Arabinose (L-Ara4N) beziehungsweise Phosphoethanolamin (PEtn). Durch die Anbindung dieser Moleküle vollführen die LPS eine Strukturänderung, die wiederum in einer Herabsetzung der negativen Ladung der äußeren Membran und damit einer

erniedrigten elektrostatischen Interaktion zwischen Colistin und den LPS resultiert. Damit sinkt die Affinität des Antibiotikums zur Zielzelle (28).

Die Biosynthese von L-Ara4N sowie PEtn wird durch je Zweikomponentensysteme, PmrA/PmrB und PhoP/PhoQ mediert. Namensgebend für dieses System ist die Funktionsweise aufgrund zweier Proteine, nämlich einem Sensor- und einem Regulationsprotein. Ein Transmembranprotein stellt den Sensor dar und reagiert auf ein äußeres Signal. Dies ist dann der Fall, wenn eine Phosphatgruppe an einer bestimmten Stelle gebunden wird, genauer gesagt, ein Histidin phosphoryliert wird. Da das Sensorprotein als Kinase fungiert, überträgt es in weiterer Folge die Phosphatgruppe auf das Regulatorprotein, welches wiederum durch diesen Prozess aktiviert wird. Das Regulatorprotein ist ein zytoplasmatisches Protein und ist somit in der Lage, in aktivierter Form in die Genexpression einzugreifen (28, 42).

Das Operon *pmrCAB*, welches eine Funktionseinheit der DNA darstellt, kodiert für drei verschiedene Enzyme. Zu diesen zählen Phosphoethanolamin-Phosphotransferase PmrC, das zytoplasmatische Regulatorprotein Pmr A und das Sensorprotein PmrB, welches gleichzeitig eine Kinase darstellt (42).

Mutationen in den Zweikomponentensystemen PmrA/PmrB und PhoP/PhoQ sind die Ursache für chromosomale Colistinresistenzen. So wurden zahlreiche Mutationen in PmrA oder PmrB Genen in colistinresistenten *E. coli* Isolaten von gesunden als auch erkrankten Schweinen gefunden. Mutationen innerhalb des Zweikomponentensystems PmrA/PmrB werden am häufigsten in Verbindung mit chromosomaler Resistenzvermittlung gegenüber Colistin beschrieben (28).

Die Plasmid-vermittelte Colistinresistenz beruht ebenso auf einer Strukturmodifikation der Lipopolysaccharide. Das *mcr-1* Gen kodiert für die MCR-Phosphoethanolamin-Transferase, die wiederum den Transfer von Phosphoethanolamin auf das Lipid A katalysiert, dadurch die Struktur des Lipids verändert und in einer kationischen Ladungsverschiebung resultiert. Die Produktion des *mcr-1* Proteins führt zu einer vier- bis achtfachen Erhöhung der MHK gegenüber Polymyxinen (25, 28, 42).

Das Gen wurde auf unterschiedlichen Plasmiden identifiziert wie beispielsweise IncI2, IncHI2, IncP, IncX4, IncY, IncFI, und IncFIB. Auch dessen Genomgröße variiert zwischen 58 und 251 kb (Kilo-Basenpaar). Das *mcr-1* Gen weist 11 Variationen auf, diese werden als *mcr-1.2- mcr 1.12* deklariert (42).

Das Vorliegen einiger Berichte über Co-Lokalisationen des *mcr-1* Gens bei multiresistenten Bakterien wie beispielsweise ESBL- (Extended-Spectrum-Betalaktamasen), sowie Carbapenemase-produzierender *E. coli* bei Schweinen und Geflügel betont ebenso die Wichtigkeit aber auch die Herausforderungen einer spezies- und länderübergreifenden Gesundheitsstrategie (46). Die Co-Lokalisation von *mcr-1* und ESBL-Genen auf demselben Plasmid erhöht die Möglichkeit einer Resistenz dieser Bakterien gegenüber Colistin und Cephalosporinen, ohne dass diese Antibiotika zum Einsatz bei einem Individuum kamen. Dieses Gefahrenpotential bezieht sich auch auf das gleichzeitige Vorliegen anderer Resistenzgene auf demselben Plasmid (47).

So beschreibt etwa eine Studie aus China eine Reihe von Geflügelisolaten, die neben *mcr-1* auch Carbapenemase NDM-1 (Neu-Delhi Metallo-Beta-Laktamase) co-produzierten. Weitere Untersuchungen ergaben, dass dieselben multiresistenten Isolate aus dem Umfeld, wie Fliegen und Hunden des betroffenen Betriebes, aufgefunden werden konnten (48).

Innerhalb einer in Deutschland durchgeführten Studie wurden im März 2016 die Isolate einer 577 Proben umfassenden Datenbank, die sich aus Human,- Tier- und Umgebungsproben zusammensetzt, sequenziert. Diese Gesamtexomsequenzierung ermittelte das *mcr-1* Gen in vier *E. coli*-Probenisolaten, wobei drei von Schweinen und eine von einem Menschen stammte. Jene drei aus Schweinen isolierten Stämme zeigten sich als Extended-Spectrum-Betalaktamase produzierende Bakterien und wiesen zusätzlich zum *mcr-1* Gen das blaCTX-M-1-Gen auf. Das Isolat, das von einem Menschen stammte, wies zusätzlich das für Carbapenemase kodierende blaKPC-2-Gen auf. Auch in dieser Studie wurde somit die Gefahr unbehandelbarer Infektionen durch bereits nachgewiesene multiresistente Keime, wie in diesem Fall gegen Colistin und Cephalosporine der dritten Generation oder Colistin und Carbapenemasen, belegt. Bei drei Isolaten konnte das *mcr-1* Gen dem IncHI2-Typus zugeordnet werden. Ein vom Schwein stammendes Isolat wurde auf einem IncX4-Plasmid nachgewiesen. Dies bestätigt die Möglichkeit verschiedener Wege zur horizontalen Resistenzvermittlung (46).

Eine andere alarmierende Entdeckung betraf den Nachweis eines chromosomal lokalisierten *mcr-1* Gen in zwei Isolaten von colistinresistenten *E. coli* bei Kälbern. Das *mcr-1* Gen wurde in Verbindung mit der Insertionssequenz IS_{Apl1}-*mcr-1* nachgewiesen, welche wiederum im Plasmid pHNSHP45 aufgefunden wurde. Insertionselemente wie dieses besitzen die Fähigkeit, über einen rekombinationsähnlichen Vorgang innerhalb des Genoms seine Lokalisation zu verändern (49). Diese Feststellung lässt den Schluss zu, dass das *mcr-1* in der Lage ist, zwischen der chromosomalen Lokalisation sowie verschiedenen Plasmiden und Bakterienstämmen zu translozieren (28, 50).

Mittlerweile wurde das *mcr-1* Gen weltweit bei Menschen, Lebensmittel-liefernden Tieren sowie deren Fleischerzeugnisse nachgewiesen. Zu diesen zählen unter anderem Hühner, Puten, Schweine, Rinder sowie Kälber. Auch sind Übertragungen des Resistenzgens vom Schwein auf den Menschen dokumentiert (28).

3.2.1.3 Entdeckung, Verwandte und Lokalisation des *mcr-1* Gens

Noch bevor der Nachweis des *mcr-1* Gens gelang, zeigten einige Studien in Bereichen der Human- und Veterinärmedizin Colistinresistenzen auf, deren Isolate aber weder Mutationen in *PmrA* noch in *PmrB* Genen aufwiesen. Die Entdeckung der Plasmid-vermittelten *mcr-1* Proteine lieferte schließlich die Erklärung zu einer weiteren Form der Resistenzvermittlung von gramnegativen *Enterobacteriaceae* gegen Colistin (28).

Im November 2015 wurde erstmals der Nachweis des auf einem Plasmid lokalisierten *mcr-1* Gens erbracht. Die Entdeckung erfolgte innerhalb eines Routineüberwachungsprogramms, das die Untersuchung der Antibiotikaresistenzen des Kommensalkoims *E. coli* in Lebensmittel-liefernden Tieren in China umfasste. Während dieses Programms konnte in den vergangenen Jahren ein signifikanter Anstieg der Colistinresistenzen verzeichnet werden. Daraufhin wurde dem Verdacht der Plasmid-vermittelten Resistenzübertragung nachgegangen (51).

Dafür wurden zwischen April 2011 und November 2014 Proben innerhalb des Krankensektors, Schlachthöfen, Vertriebsfleisch und landwirtschaftlichen Schweinebetrieben in verschiedenen Regionen Chinas gesammelt und untersucht. Für die

weitergehenden Untersuchungen, die eine Genomsequenzierung und Subklonierung umfassten, wurde willkürlich der *E. coli* Stamm SHP45 ausgewählt, der eine MHK von 8 mg/L gegenüber Colistin aufwies. Dieser Stamm wurde aus einem Betrieb mit Schweine-Intensivtierhaltung isoliert und zeigte eine Vielzahl an Resistenzen gegen die Antibiotikagruppen. Aus diesem konnte das Resistenzplasmid pHSNHP45 extrahiert werden, welches anschließend für Plasmid-Transfer-Experimente genutzt wurde. Um das für die Resistenz verantwortliche Gen zu identifizieren, wurde eine Gesamtexomsequenzierung des Plasmids durchgeführt. Dabei wurde stromabwärts einer Insertionssequenz ein 1626 Basenpaare-umfassendes offenes Leseraster entdeckt, das einen GC-Gehalt von 49% aufwies. Dieses „ORF“ (open reading frame) wurde *mcr-1* benannt und anschließend experimentell durch Konjugation und Transformation auf den *E. coli* Stamm C600 bei einer Frequenz von 10^{-1} bis 10^{-3} Zellen pro Empfänger übertragen. Die MHK des Konjugats wies einen acht bis 16-fachen höheren Wert als jene der untransformierten Kontrolle auf. Das pHSNHP45 wurde hierbei als ein Plasmid des Typus IncI2 identifiziert (51).

Um die Verbreitung des entdeckten *mcr-1* Gens einschätzen zu können, wurden innerhalb einer retrospektiven Studie Vertriebsfleisch sowie Isolate von Schweinen in Schlachthäusern beprobt und es wurde festgestellt, dass das Auftreten von *mcr-1* positiven Proben über die Jahre stetig zugenommen hat. Die rasche Verbreitung des *mcr-1* Gens, die weiteren bekannten Resistenzmechanismen sowie die hohe *in vitro* Transferrate zwischen *E. coli* Stämmen als auch die Beständigkeit des *mcr-1* Gens in Donator- und Rezipientenzelle auch ohne selektiven Polymyxindruck, hebt die beunruhigende Konsequenz der „Pandrug-Resistance“ (PDR) hervor. Diese bezeichnet die Unempfindlichkeit von Bakterien gegen alle Wirkstoffklassen der Antibiotika. Hinsichtlich der Ungleichheit der *mcr-1* vermittelten Resistenzen bei Menschen und Tieren ist die Herkunft tierischen Ursprungs sehr wahrscheinlich. Die große Divergenz bezüglich des Vorkommens von *mcr-1* bei Menschen und Tieren könnte auch auf deren Anwendungsunterschiede zurückzuführen sein. Der hohe Colistinverbrauch könnte zu hohem selektivem Druck innerhalb der Veterinärbranche geführt haben und damit zu dem Auftreten des *mcr-1* Gens (24, 51).

Bereits kurz nach der Entdeckung des *mcr-1* Gens, wurde dessen rasche Verbreitung in Probenisolaten von *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Salmonella* und *Klebsiella pneumoniae*, isoliert aus Menschen, Tieren und der Umwelt nachgewiesen. Die bisher veröffentlichten

Studien zeigen, dass das *mcr-1* Gen bis zum jetzigen Zeitpunkt das meistverbreiteste *mcr*-Gen ist (52).

Durch die Entdeckung des *mcr-1* Gens motiviert, wurde bereits kurz darauf im Jahr 2016 der Nachweis für die Existenz des *mcr-2* Gens in Belgien erbracht. Dessen Vorkommen wurde in *E. coli* Isolaten von Schweinen und Rindern belegt. Es weist eine genetische Übereinstimmung von 80,65% mit dem *mcr-1* Gen auf, wobei *mcr-2* eine vermutlich noch höhere Transferrate als *mcr-1* zugesprochen wird und sich damit auch schneller zwischen Menschen und Tieren ausbreiten kann. Darüber hinaus wurde für das *mcr-2* Gen eine höhere Prävalenz colistinresistenter *E. coli* mit Herkunft aus Schweinen detektiert (52).

Daneben wurden bislang die Resistenzgene *mcr-3* bis *mcr-10* entdeckt, die ebenso aus verschiedenen Bakterienstämmen sowie unterschiedlicher Herkunft stammen. Diese können in weiterer Folge durch horizontale Verbreitung in verschiedene Bereiche eines Ökosystems wie Boden, Gewässer, Wildtiere oder Pflanzen gelangen. Auch ist das gleichzeitige Vorhandensein mehrerer *mcr*-Gene möglich. So haben einige Studien das Co-Auftreten der Resistenzgene in Isolaten von *E. coli* und Salmonellen in China und Europa bewiesen (52).

3.2.1.4 Strategien gegen Colistinresistenz

Seit 2017 zählt die Weltgesundheitsorganisation (WHO) Colistin zu den Wirkstoffen mit höchster Priorität in der Gruppe der antibakteriell wirksamen Substanzen („highest priority critically important antimicrobials - HPCIA“). Somit wurde Colistin in die Kategorie „very high importance for human medicine“ eingestuft. Die Expertenvereinigung „Antimicrobial Advice ad hoc Expert Group“ (AMEG), die bei der Europäischen Arzneimittelbehörde EMA angesiedelt ist, ordnet die Polymyxine der Kategorie B („Restrict“) zu. Sie sollen also nur dann eingesetzt werden, wenn die Kategorien C („Caution“) und D („Prudence“) keine Alternativen zur Behandlung von Erkrankungen beinhalten. Fluorquinolone und Cephalosporine der dritten und vierten Generation zählen ebenso zu Kategorie B. Dies bedeutet auch für die Veterinärmedizin eine eingeschränkte Anwendung, um die öffentliche Gesundheit nicht zu gefährden und die Wirksamkeit der Reserveantibiotika zu gewährleisten (25, 53).

Das oberste Ziel der WHO ist einerseits das Bestreben nach der Erhaltung der Gesundheit von Mensch und Tier und somit der Erhaltung der Wirksamkeit des Antibiotikums und andererseits die Vermeidung eines steigenden Resistenzrends vermittelt durch den horizontalen Transfer von Plasmiden (32, 33).

Neben der WHO haben auch die Europäische Union sowie die Vereinten Nationen die gesundheitspolitische Bedeutung der Resistenzproblematik erkannt und reagiert. Auf Bundesebene hat das österreichische Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz (BMSGPK) auf die Thematik mit der jährlichen Veröffentlichung des offiziellen Resistenzberichts reagiert. Dieser ist unter dem Namen „AURES - der österreichische Antibiotikaresistenz-Bericht“ zu finden (54).

Da die Resistenzentwicklung in den meisten Fällen mit der eingesetzten Wirkstoffmenge korreliert, ist die Kenntnis über die eingesetzten Mengen von Antibiotika ein wichtiger Faktor für die Entwicklung von Strategien und Restriktionsmaßnahmen im Sinne der globalen Gesundheit (55).

3.2.1.5 Colistinresistenz und Colistinverbrauch in Österreich

Bereits seit 2004 hat das Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz gemeinsam mit der Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES) Untersuchungen hinsichtlich der Antibiotikaempfindlichkeit bestimmter Zoonoseerreger und Indikatorkeime durchgeführt. Seit 2014 unterliegen alle Mitgliedsstaaten der EU aufgrund des Durchführungsbeschlusses (2013/652/EU) der Kommission einheitlichen Bestimmungen zur Ausführung der Monitoringprogramme, welche lebensmittelliefernde Tierpopulationen sowie deren Erzeugnisse umfassen.

Hinsichtlich des Durchführungsbeschlusses wurden 170 Masthühnerherden und Putenherden gegen 14 antibakteriell wirkende Substanzen beprobt. Im Jahr 2020 konnten bei den Probenisolaten von Masthühnern keine Resistenzen gegen Colistin nachgewiesen werden. Bei den Probenisolaten der Putenherden machten Resistenzanteile gegenüber Colistin weniger als 3% aus (56).

Um die akute Wichtigkeit der Resistenzthematik hervorzuheben, hat das BMSGPK in Zusammenarbeit mit der AGES den „Bericht über den Vertrieb von Antibiotika in der Veterinärmedizin in Österreich 2016-2020“ erstellt. Dieser soll als Grundlage zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen Antibiotikaresistenzen und Antibiotikaeinsatz dienen. Zur Datensammlung wurde sich die Veterinär-Antibiotika-Mengenströme-Verordnung zunutze gemacht. Durch diese sind Zulassungsinhaber und Arzneimittel-Großhändler verpflichtet, Angaben über die Vertriebsmengen von Tierarzneimittel mit antibakteriellen Substanzen zu melden. Ebenso müssen hausapothekenführende TierärztInnen Antibiotikaabgaben an landwirtschaftliche Betriebe bekanntgeben (57, 58).

So kann auch der Gebrauch von „Antibiotika von allerhöchster Bedeutung für die Humanmedizin“ genauer untersucht werden. Tabelle 1 zeigt den Vertrieb dieser Antibiotikakategorie innerhalb der letzten Jahre.

Tabelle 1: Vertriebsmengen der Polymyxine in der Veterinärmedizin von 2017-2021 in Österreich (58)

Jahre	2017	2018	2019	2020	2021	Differenz
Vertriebsmenge in Tonnen	1,67	1,79	1,53	1,54	1,47	-0,07

In Österreich belegt Colistin hinsichtlich seiner Abgabemenge Platz sechs aller für die Veterinärmedizin zugelassenen Antibiotikawirkstoffgruppen (57, 58).

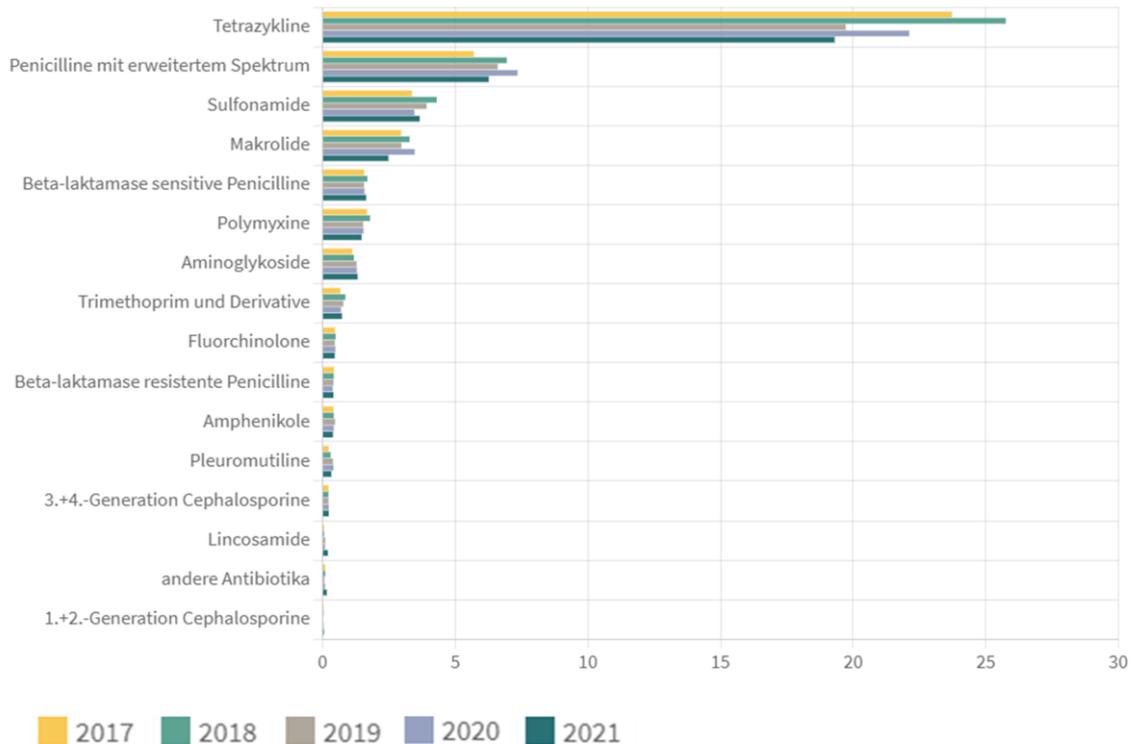


Abbildung 1: Vertriebsmengen in Tonnen nach Wirkstoffgruppen in der Veterinärmedizin von 2017-2021 in Österreich (57, 58)

Aus Tabelle 1 sowie Abbildung 1 ist eine Abnahme der Polymyxinanwendungen von 0,07t (Tonnen) ersichtlich.

Der „Resistenzbericht Österreich AURES 2020“ legt den Verbrauch antimikrobieller Substanzen im Human-, Veterinär- und Lebensmittelbereich des Jahres 2020 dar. In der Abbildung 2 ist der Verbrauchstrend von Colistin innerhalb der Humanmedizin in Österreich über die letzten Jahre ersichtlich. Angegeben ist dieser in DDD (Defined Daily Doses), also Tagestherapiedosen pro 1000 Einwohner (56).

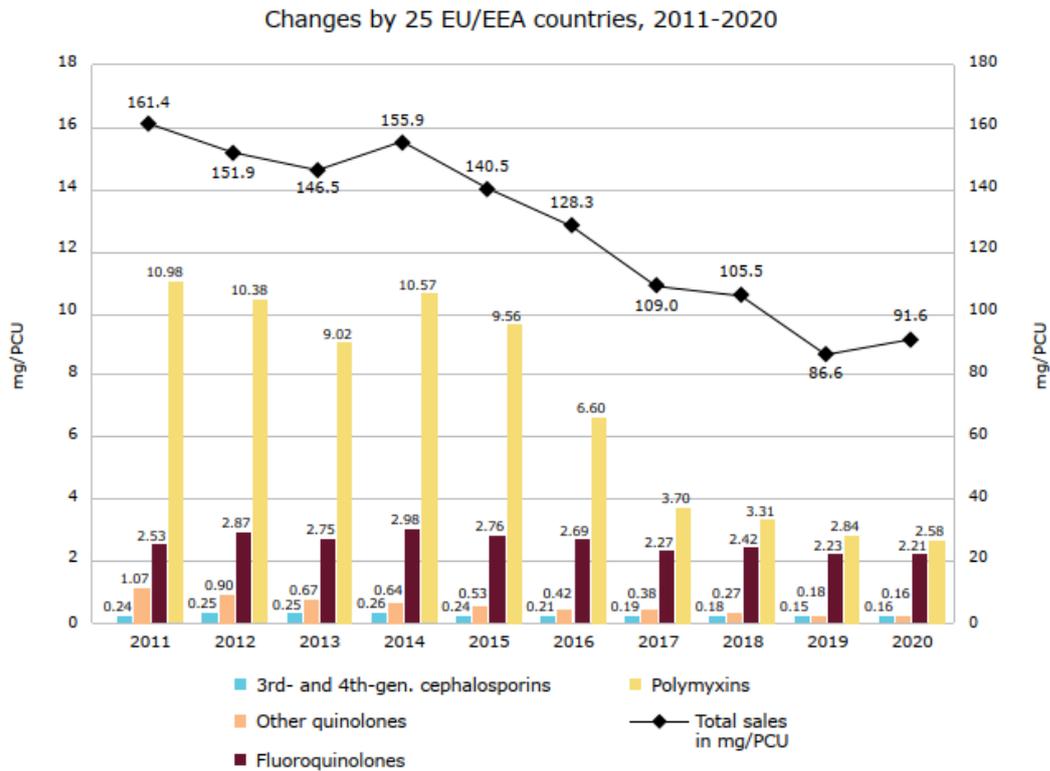
J01X Andere Antibiotika	2011	2018	2019	2020
J01XB01 Colistin	-	0,0754	0,0449	0,0303

Abbildung 2: Colistinverbrauch im stationären Bereich im Jahr 2011, 2018-2020 in DDD/1000 Einwohner pro Tag (56)

3.2.1.6 Colistinresistenzen und Colistinverbrauch: Situation in der Europäischen Union

Innerhalb der europäischen Union nimmt Colistin Platz fünf der am häufigsten angewandten Antibiotika ein. Um die Abgabemengen der antibakteriellen Substanzen an verschiedene Tierarten untereinander vergleichen zu können, müssen diese hinsichtlich der jeweiligen Tierpopulationen normiert werden. Die EMA hat dafür einen Normierungsfaktor eingeführt. Die „Population Correction Unit“ (PCU) ist ein technisches Maß, das sich auf ein Kilogramm Körpergewicht bezieht und somit den direkten Vergleich erlaubt (57).

Abbildung 3 zeigt den Vertriebstrend der Antibiotikagruppen mit höchster Priorität für die medizinische Behandlung von Menschen innerhalb 25 EU-Länder. Diese lassen europaweit eine negative Trendänderung der Polymyxinabgaben zwischen 2011 und 2020 erkennen (59).



¹ Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czechia, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden and the United Kingdom.

Abbildung 3: Änderungen im Verkauf der Wirkstoffgruppen mit „höchster Priorität in der Humanmedizin“ in EU-Ländern in der Veterinärmedizin von 2011-2020 (59)

Unter der Annahme, dass es sich bei der angeführten Wirkstoffgruppe der Polymyxine ausschließlich um Colistin handelt, obwohl in geringsten Mengen auch Bacitracin und Polymyxin B vorherrschend sein können, kann für das Jahr 2011 ein Wert von 10.98 mg/PCU und für 2020 ein Wert von 2.58 mg/PCU ermittelt werden (59, 60).

Abbildung 4 zeigt die Änderungen im Verkauf von Polymyxinen in mg/PCU für die Anwendung bei Lebensmittel-liefernden Tieren in den einzelnen EU-Ländern von 2010 bis 2020. In Österreich konnte ein Anstieg um 0,7 mg/PCU von 2013 auf 2014 verzeichnet werden. Seit 2014 pendeln die Werte im Bereich von 1,6 mg/PCU. Diese Abbildung hebt außerdem den als sehr positiv zu bewertenden negativen Verkaufstrend von Polymyxinen in Belgien, Frankreich, Deutschland, Italien, Litauen, Luxemburg, die Niederlande, Spanien, Schweiz und England hervor.

Country	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Trends 2010-2020
Austria	1.0	1.0	0.7	0.9	1.6	1.6	1.6	1.7	1.9	1.6	1.6	
Belgium	6.0	5.4	5.8	4.7	3.4	2.8	2.4	2.1	2.0	1.8	1.6	
Bulgaria		3.2	3.8	2.7	0.5	3.6	2.3	2.9	3.7	1.6	5.4	
Croatia					3.6	2.3	3.4	3.0	2.6	1.5	2.7	
Cyprus		8.2	8.1	8.4	11.1	12.4	11.1	10.4	12.8	14.0	15.9	
Czechia	0.9	0.6	0.9	1.1	1.0	1.0	0.8	0.6	0.7	0.6	0.6	
Denmark	0.3	0.2	0.2	0.2	0.4	0.5	0.5	0.2	<0.01	<0.01	<0.01	
Estonia	3.5	4.3	4.9	5.8	3.1	1.3	0.7	1.1	0.8	0.5	0.3	
France	8.6	7.7	6.7	5.9	7.0	4.0	2.8	2.2	1.8	1.4	1.4	
Germany		14.8	14.8	14.6	12.2	9.2	7.9	8.5	8.6	7.9	7.3	
Greece						3.4	1.0	1.3	1.6	1.5	1.9	
Hungary	6.9	8.9	7.8	10.0	7.1	9.6	12.2	14.9	10.1	9.3	7.5	
Italy	40.2	30.7	30.1	27.6	29.4	26.1	15.1	5.2	2.7	0.9	0.7	
Latvia	1.0	1.0	2.5	1.5	0.8	0.9	0.9	1.3	1.9	1.3	0.8	
Lithuania	1.7	1.4	1.3	0.1	0.1	0.6	1.0	0.7	0.2	0.7	<0.01	
Luxembourg			1.7	3.1	2.4	1.5	1.0	1.0	0.6	0.4	0.4	
Malta								4.9	1.9	0.1	0.5	
Netherlands	2.3	1.6	0.97	0.6	0.5	0.5	0.3	0.3	0.4	0.4	0.5	
Poland		4.1	4.0	4.4	5.0	5.9	5.6	7.4	7.4	10.6	9.1	
Portugal	15.1	7.9	18.6	19.0	17.6	14.6	13.5	10.9	12.6	8.5	11.7	
Romania					6.5	7.4	5.6	4.1	6.4	2.5	2.2	
Slovakia		1.2	2.1	1.1	1.5	1.1	1.2	1.7	1.4	1.3	2.0	
Slovenia	0.1	0.1	0.1	0.04	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	
Spain	33.0	33.5	29.4	21.5	36.1	34.9	22.0	4.4	3.3	0.9	0.4	
Switzerland					0.9	0.6	0.5	0.4	0.3	0.3	0.2	
United Kingdom	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	

Abbildung 4: Änderungen im Verkauf von Polymyxinen in mg/PCU für die Anwendung bei Lebensmittel-liefernden Tieren in EU-Ländern von 2010-2020 (59)

Obwohl retrospektive Studien zeigten, dass das *mcr-1* Gen in einigen Bakterienstämmen seit Jahrzehnten zu finden war und der Anteil nachgewiesener Colistinresistenzen in den Ländern der EU gering war, gaben die kürzlich zuvor aus China übermittelten Daten, die einen rapiden Anstieg der Colistinresistenzen voraussagen drohten, der europäischen Kommission Anlass, der EMA eine Aktualisierung der 2013 veröffentlichten „Empfehlung zum Einsatz des Antibiotikums Colistin bei Tieren“ anzuordnen (61, 62).

Aufgrund dessen veröffentlichte die AMEG der EMA 2016 unter dem Titel „Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health“ die überarbeitete Version.

Die Kernaussage dieser ist, dass der Einsatz von Colistin auf die Anwendung von *E. coli* bedingten Gastrointestinalinfektionen beschränkt, die Therapiedauer auf das mögliche Minimum der jeweiligen Indikation restringiert und die Verwendung als Prophylaxemaßnahme verboten werden soll. Ein weiterer wichtiger Punkt der Empfehlung ist der Hinweis auf die Notwendigkeit, Colistin der Kategorie B der AMEG Antibiotika Kategorisierung zuzuordnen, welcher bereits umgesetzt wurde. Auch unterstreicht die EMA die Wichtigkeit, die Reduktion der Colistinanwendungen nicht durch den Einsatz anderer Antibiotika der Kategorie B auszugleichen beziehungsweise sofern möglich, aufgrund von besseren Haltungsbedingungen von Nutztieren, Biosecurity-Maßnahmen, Impfstrategien und gesteigertem Tierwohl auch den Einsatz anderer antibakterieller Substanzen zu vermeiden (61).

Innerhalb der EU-Mitgliedsstaaten kann eine große Ungleichheit der eingesetzten Colistinmengen festgestellt werden, welche weitestgehend ungeklärt ist. Konkret empfiehlt die EMA eine Reduktion der Colistinapplikationen in Ländern mit hohen PCU-Werten auf das maximale Ziellevel von 5 mg/PCU, bei Ländern mit moderaten PCU-Werten auf 1 mg/PCU oder weniger. Mitgliedsstaaten seien außerdem dazu aufgefordert, strengere nationale Ziele zu setzen, welche sich an einem PCU-Wert unter 1 mg/PCU orientieren. Dies würde eine Reduktion der eingesetzten Colistinmengen bei Berücksichtigung der zeitgleichen Verkaufszahlen und dem zwischen 2011 und 2013 bereits beobachteten Rückgang dieser um 65% bedeuten. Das Erreichen dieser Ziele soll in einer drei- bis vierjährigen Periode umgesetzt sein. Auch wurde empfohlen, Vermarktung, die für die Kombination von Colistin mit anderen antibakteriell wirksamen Substanzen wirbt, zu unterbinden (61).

Auf Anfrage der europäischen Kommission haben die Agenturen ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) und die EMA in Zusammenarbeit den „JIACRA III - Antimicrobial consumption and resistance in bacteria from humans and animals“ veröffentlicht. Es ist der dritte Bericht dieser Kooperationsgemeinschaft, der die Themen Antibiotikaresistenzen sowie den Antibiotikaverbrauch von Mensch und Lebensmittel-liefernden Tieren behandelt und die Korrelation zwischen Resistenzaufreten und Verbrauch untersucht.

In diesem Bericht wird auch auf die ungleiche Verteilung zwischen Polymyxinverbrauch innerhalb der EU-Länder in der Human- und Veterinärmedizin aufgezeigt. So betrug im Jahr 2017 der bevölkerungsgewichtete Verbrauch von Polymyxinen 0.06 mg/kg estimated biomass in der humanen Bevölkerung und 3.2 mg/kg innerhalb der Lebensmittel-liefernden Tierpopulationen. Diese ungleiche Verteilung des Polymyxinverbrauchs der einzelnen EU-Länder ist in Abbildung 5 grafisch veranschaulicht (63).

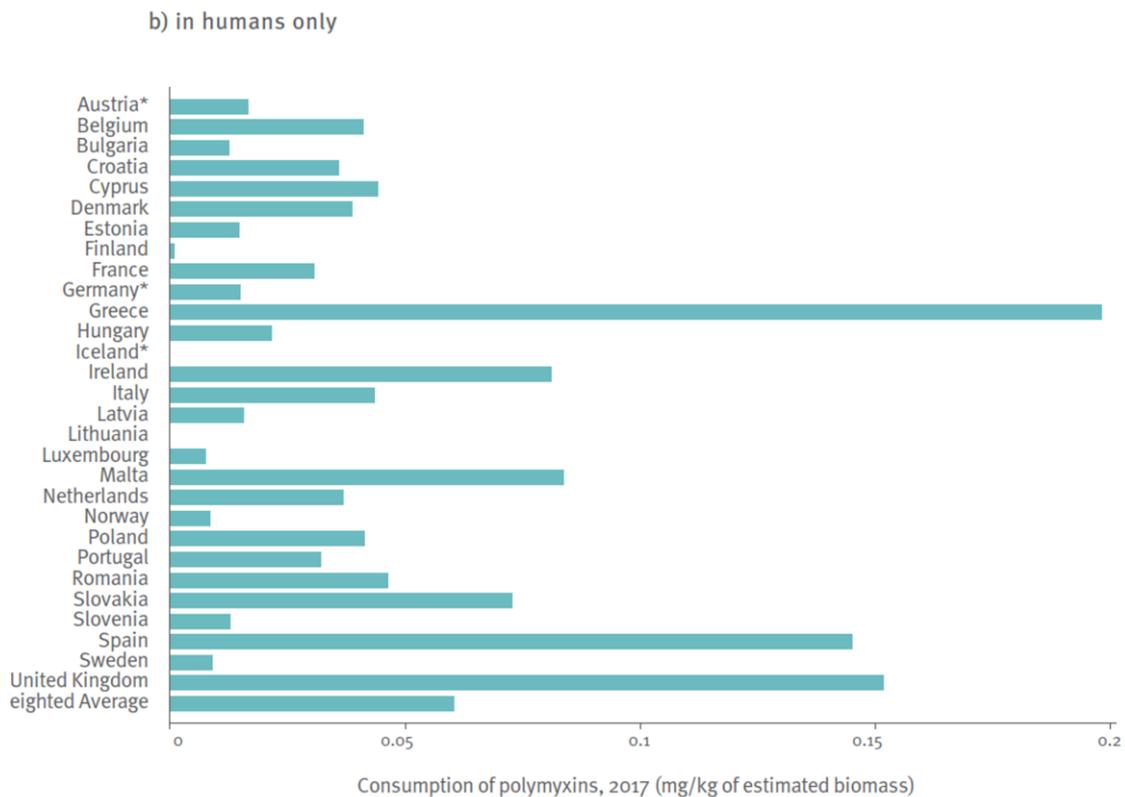
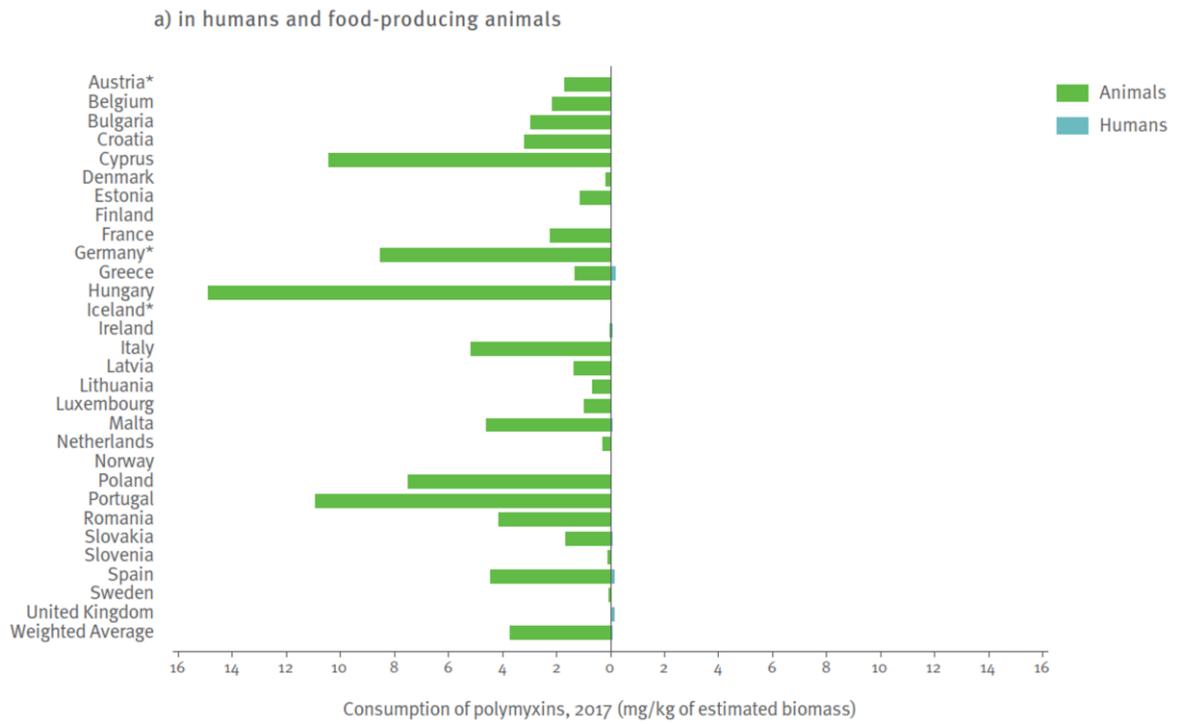


Abbildung 5: Polymyxinkonsum von Menschen und Lebensmittel-liefernden Tieren in 29 EU-Ländern im Jahr 2017(63)

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Verbrauch und Resistenz der Polymyxine zu untersuchen, wurden die festgestellten Colistinresistenzen von Lebensmittel-liefernden Tieren und deren Verbrauchszahlen jeweils innerhalb eines zwei-Jahres-Intervalls für die Jahre 2014-2018 verglichen. Die Abbildung 6 stellt diesen Zusammenhang dar (63).

Year	Countries	Model	Odds ratio	p-value	95% CI
2014–2015	AT, BE, BG, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, HR, HU, IE, IT, LT, LV, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, UK (n=26)	2	1.53	<0.001	1.21–1.94
2015–2016	AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, EL, ES, FI, FR, HR, HU, IE, IT, LT, LV, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, UK (n=28)	2	1.68	<0.001	1.39–2.05
2016–2017	AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, EL, ES, FI, FR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LV, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, UK (n=29)	2	1.91	<0.001	1.50–2.44
2017–2018	AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, EL, ES, FI, FR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LV, NL, NO, MT, PL, PT, RO, SE, SI, SK, UK (n=30)	2	1.87	<0.001	1.43–2.43

CI: confidence interval. Odds ratio varies from 0 to infinity. When odds ratio equals 1 or CI includes 1, the association is not considered statistically significant. The category 'food-producing animals' includes broilers, turkeys, pigs and calves.

Abbildung 6: Zusammenhang zwischen dem Verkauf von Polymyxinen zur Anwendung an Lebensmittel-liefernden Tieren in mg/kg estimated biomass und der Wahrscheinlichkeit von Polymyxinresistenzen in *E. coli* in Lebensmittel-liefernden Tieren (63)

Die festgestellte Colistinresistenz innerhalb der untersuchten Länder war gering. Auch wurde die ungleiche Aufteilung des Colistinverbrauchs innerhalb der EU bestätigt. Diese zeigte sich durch Verbrauchszahlen von null bis nahezu 40 mg/kg estimated biomass. Ein statistisch signifikant positiver Zusammenhang zwischen Colistinresistenz im Indikatorkeim *E. coli* und Polymyxinverbrauch in Lebensmittel-liefernden Tieren wurde innerhalb der Periodenabschnitte beobachtet. Die ermittelten Colistinresistenzen bei Schweinen wurden innerhalb der EU als sehr gering eingestuft. Bei Geflügel waren diese häufiger aufzufinden, deren Auftreten wurde aber dennoch als gering wahrgenommen (63).

Eine in Europa durchgeführte Studie hat das Vorkommen sowie die Ausbreitungsdynamik des *mcr-1* Gens in 11 europäischen Ländern analysiert. Hierfür wurden Probenisolate von Hühnern und Schweinen in Schlachthäusern in der Zeit von 2002 bis 2014 herangezogen und auf *mcr-1* sowie *mcr-2* Gene in *E. coli* und *Salmonella* spp. untersucht. Die positiv auf *mcr-1* getesteten Proben wurden in Deutschland, Spanien, Frankreich und den Niederlanden nachgewiesen. 1,4% der *E. coli* und 5,2% der *Salmonella* spp. Isolate zeigten eine Colistinresistenz, wobei 0,7% der *E. coli* und 0,1% der *Salmonella* spp. Proben das *mcr-1* Gen aufwiesen. Diese wurden innerhalb der Zeitperiode von 2008-2014 ermittelt, die Jahre 2002-2006 lieferten keinen positiven *mcr-1* Nachweis. Während die Jahre 2008-2009 eine geringe *mcr-1* Prävalenz von 0,5% vorwies, zeigten die Jahre 2013-2014 einen Anstieg der *mcr-1* positiven Isolate auf 1,7%. Dabei zeigten die aus Hühnern isolierten Stämme eine höhere

Nachweisrate. Die *E. coli* Isolate wiesen unterschiedliche Phylotypen auf, deren Diversität wiederum den horizontalen Gentransfer begünstigen. Die resistenten Isolate wiesen eine signifikant höhere Resistenz ($p \leq 0,05$) gegenüber anderen Antibiotikagruppen auf. Innerhalb der Studie wird auch auf den großen Unterschied der *mcr-1* Prävalenz in Isolaten humaner und tierischer Herkunft sowie auf die um ein hundertfaches höheren Anwendungsmengen in der Veterinärmedizin hingewiesen. Durch diese Studie wird das *mcr-1* Vorkommen in Europa Jahre vor dessen Entdeckung bestätigt (38).

Der erste Bericht über das Auftreten von *mcr-1* in Europa erfolgte in Frankreich im Jahr 2004. Eine weitere Studie, die sich mit Diarrhoe und der Ödemkrankheit beim Schwein beschäftigte, ermittelte keine *mcr-1* Nachweise zwischen 1999 und 2007 jedoch positive von 2008-2015 (38).

In China wurden das erste Erscheinen des *mcr-1* Gens innerhalb einer Geflügelpopulation in den 1980er Jahren datiert. Die Autoren jenes Berichts beschreiben vereinzelte Nachweise des Resistenzgens bis zum Jahre 2008. Daraufhin verzeichnen sie einen starken Anstieg von 2009 (5,2%) bis 2014 (30,0%) (64).

Die ECDC hat in Zusammenarbeit mit der EFSA den Bericht „The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019“ veröffentlicht. Dieser Bericht beinhaltet unter anderem Informationen über die Colistin-Resistenzentwicklung bei *E. coli* in den Jahren 2018 und 2019. Für diese Jahre wird das Auftreten der Colistinresistenz im Indikatorkeim *E. coli* als generell selten bezeichnet. Die Mehrheit der Mitgliedsstaaten verzeichnete keine Colistinresistenzen. Auf EU-Ebene betrachtet, verzeichnen die Mitgliedsstaaten sehr geringe Prävalenzen bei Schweinemastbetrieben von 0,6% und bei Broilerbetrieben von 0,7%. Mit dem Auftreten des *mcr-1* Gens mit 3,2% bei Putenmastbetrieben, wird ihnen ein „geringes“ Vorkommen zugeschrieben. Colistinresistenzen in Kälber- und Putenisolaten konnten am häufigsten verzeichnet werden. Mit 2,3% Resistenzaufkommen in Kälberisolaten wurde in Belgien die höchste Rate ermittelt. Isolate aus Putenmastbetrieben erreichten die höchsten Resistenzwerte mit 9,0% in Deutschland und 17,4% in Portugal. Auch in anderen Mitgliedsstaaten der EU wurden Resistenzgene in Schweine- und Broilerpopulationen ermittelt. Die höchsten Resistenzwerte waren bei Isolaten aus Schweinen mit 9,0% in Portugal und bei Broilern mit 4,7% in Deutschland und Rumänien. Um eine statistische Signifikanz ($p \leq$

0.05) der Trendbewegung zu ermitteln, wurden Daten aus jeweils drei Jahren im Zeitraum 2014-2019 gesammelt und ausgewertet. Auf EU-Ebene konnten somit keine positive Trendentwicklung für Schweine und Kälber und abnehmende Trends für die Geflügelpopulation ermittelt werden. In der Einzelbewertung der Länder ließ sich für Deutschland eine abnehmende Resistenzentwicklung, für Frankreich, Griechenland, Polen und Portugal ein zunehmender Resistenztrend erkennen (65).

In Spanien wurde eine Longitudinalstudie durchgeführt, die das Auftreten der *mcr-1* vermittelten Resistenzproblematik und die Verkaufsmengen von Polymyxinen in der Veterinärmedizin vergleichen und in Verbindung setzen soll. Der Anstieg der Colistinresistenzen der im letzten Jahrzehnt verzeichnet werden konnte, veranlasste die „Spanish Agency of Medicines and Medical Products“ (AEMPS) zur Entwicklung eines Aktionsplans, um der weiteren Aufwärtsentwicklung des *mcr-1* Vorkommens entgegenzuwirken. Am Beispiel der Empfehlung der EMA zu dem Umgang mit Colistin, wurde 2016 die „Reduce Porcino“ Strategie entwickelt, deren Ziel die Reduzierung des Colistinverbrauchs auf einen Wert von 5 mg/PCU innerhalb von drei Jahren war. 80% der Schweinebetriebsbesitzer folgten dieser Strategie und konnten somit den Colistineinsatz um 97% reduzieren (66).

Das Vorkommen von *mcr-1* wurde innerhalb dieser Studie in einem Zeitraum von 1998 bis 2021 untersucht. Die Probensammlung erfolgte im Rahmen des nationalen Antibiotikaresistenzen-Überwachungsprogramms durch Beprobung von Blinddärmen am Schlachthof. Der erste *mcr-1* Nachweis erfolgte hierbei im Jahr 2004. Ab diesem Zeitpunkt konnte ein Anstieg der *mcr-1* positiven Isolate auf 44% der untersuchten Proben im Jahr 2010 beobachtet werden. 2015 erreichte das *mcr-1* Vorkommen seinen Höhepunkt mit 66%. Seit 2017 konnte wiederum eine abnehmende Trendentwicklung erfasst werden. So wurden 2017 54% der untersuchten Isolate als positiv deklariert. 2021 waren es nur noch 18%, während es beispielsweise 2008 32% waren. Diese Werte wurden anschließend mit den Verkaufszahlen der Polymyxine in Spanien innerhalb derselben Zeitperiode verglichen. Dabei konnten nicht nur für das Auftreten der *mcr-1* Gene, sondern auch für die Verkaufszahlen der Polymyxine ab 2015 ein Negativtrend nachgewiesen werden. Im Jahr 2015 wurde nicht nur die höchste *mcr-1* Nachweisrate ermittelt, sondern auch der höchste Wert der Polymyxinverkäufe innerhalb der EU mit 34,9 mg/PCU in Spanien. Während es 2016 noch 22,02 mg/PCU waren, verzeichneten die Jahre 2017 noch 3,3 mg/PCU, gefolgt von 2018 mit 0,9 mg/PCU, sowie

2019 und 2020 mit 0,4 mg/PCU. Somit wurde, wie von der EMA empfohlen, der Polymyxinverbrauch seit 2016 auf unter 5 mg/PCU in einem Zeitrahmen von drei bis vier Jahren gesenkt. Diese dramatische Reduktion des Polymyxinverbrauchs ist in der Abbildung 7 zu sehen (66).

Weiters setzt die Abbildung 7 die *mcr-1* Nachweise mit den Verkaufszahlen von Polymyxinen in der Veterinärmedizin in Spanien von 2010-2020 in Verbindung. Nach einem rapiden Verkaufsanstieg zwischen 2013 und 2015 konnte ein massiver Anstieg von *mcr-1* positiven qPCR-Proben (quantitative Polymerasenkettenreaktion) verzeichnet werden. Der drastische Rückgang des Polymyxineinsatzes ab 2016 ging mit einem enormen Rückgang der positiven *mcr-1* Proben einher (66).

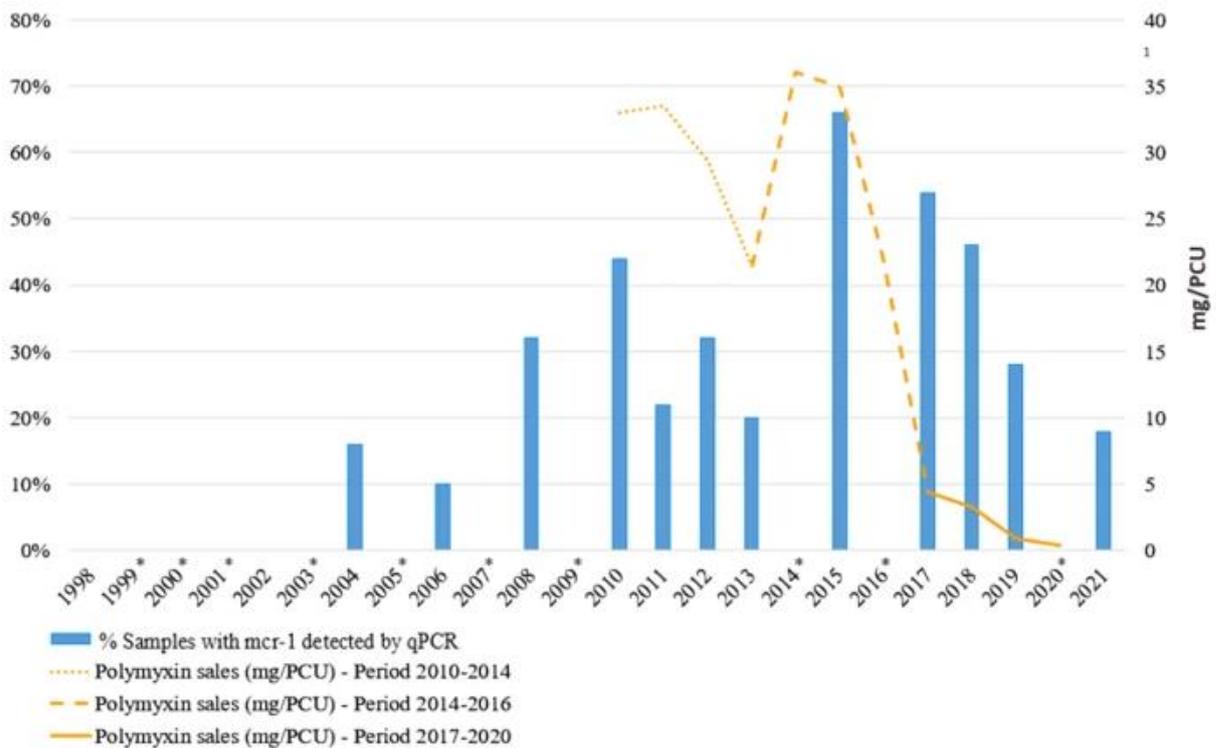


Abbildung 7: *mcr-1* Nachweise sowie Verkaufszahlen von Polymyxinen in der Veterinärmedizin in Spanien von 2010 bis 2020 (66)

In den Jahren von 2017 bis 2021 konnte eine abnehmende Entwicklung der *mcr-1* Nachweise sowie der Polymyxinabgabe verzeichnet werden. Die nachgewiesenen Colistin-resistenten Proben zeigten hierbei eine langsamere Abnahme als die Polymyxinverkäufe, was auf Gen-Umwelt-Interaktionen zurückzuführen ist. Die Studie weist auch auf eine hypothetische Reduzierung des selektiven Drucks auf die intestinale Bakterienpopulation hin, die das Überleben Colistin-empfindlicher Bakterien erlauben, was mit den Einschätzungen der ECDC, EFSA und EMA übereinstimmt (66).

Eine 2021 durchgeführte österreichische Studie beschäftigte sich mit der phäno- und genotypischen Charakterisierung von *E. coli* Stämmen, die aus Schweinepopulationen isoliert wurden. Innerhalb dieser Studie wurden 102 *E. coli* Isolate von erkrankten Schweinen untersucht und bezüglich ihrer Antibiotikaresistenzen sowie Resistenzmechanismen untersucht. Hierbei wurden bei drei Isolaten und somit 2,94% der getesteten Proben *mcr*-Gene und erhöhte MHK-Werte nachgewiesen. Dabei handelte es sich jeweils um das *mcr-1.1* Gen, welches in allen Fällen auf einem IncX4 Plasmid lokalisiert war. Zwei der colistinresistenten Isolate zeigten auch Resistenzen gegenüber Penicillinen, Tetrazyklinen und Trimethorpim-Sulfamethoxazole, was das Risiko der Wirkungseinbußen hervorhebt (22).

3.3 Grenzwerte

Um die Ergebnisse einer Empfindlichkeitsüberprüfung interpretieren zu können, bedarf es einer Orientierung anhand von Grenzwerten. Diese werden vom European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) und dem Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) veröffentlicht.

EUCAST ist ein Netzwerk von etablierten Experten unter der Schirmherrschaft der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), dem ECDC und dem European National Breakpoint Committee (NAC). Das EUCAST Komitee hat es sich zum Ziel gemacht, die antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung mitsamt deren Grenzwerten im Rahmen einer europäischen Norm zu standardisieren. Regelmäßig werden die Grenzwerte sowie Qualitätskriterien hinsichtlich der *in vitro* Empfindlichkeitsprüfung basierend auf internationalen Sammlungen wissenschaftlicher Studien, dem intensiven Wissensaustausches mit der pharmazeutischen Industrie als auch staatlichen Überwachungsprogrammen, veröffentlicht.

Zudem steht EUCAST in enger Zusammenarbeit mit der EMA, aufgrund dessen sich die Richtlinien der EUCAST auf den von der EMA deklarierten Indikationen sowie den gebräuchlichen Dosierungen der Antibiotika-Therapie in Europa stützen. Hinsichtlich des „public health“-Aspektes, agiert EUCAST auch unterstützend für die ECDC sowie weitere diverse europäische Gesundheitsorganisationen (67).

Das CLSI ist eine amerikanische, ehrenamtlich geführte, von internationalen Mitgliedern unterstützte Non-Profit-Organisation. Die Organisation fördert die Entwicklung und Qualitätsmaßnahmen von Laborpraktiken. In unterschiedlichen Fachgebieten, welche beispielsweise Labor-Grundlagen, Qualitäts- sowie Informationsmanagement umfassen, entwickelt das CLSI international anerkannte Laborstandards. Dies wird durch die enge Zusammenarbeit mit Experten aus dem Gesundheitswesen, staatlichen Organisationen sowie der Industriebranche möglich (68).

Beide Organisationen haben es sich zum Ziel gesetzt, Grenzwerte und Methoden bezüglich der mikrobiologischen Resistenzentwicklung zu harmonisieren. Diese Grenzwerte helfen nicht nur die erhobenen Daten miteinander in Verbindung zu setzen und zu interpretieren, sie sind auch wichtig, um Resistenzentwicklungen frühzeitig erkennen zu können (67, 68).

Als Methode zur Empfindlichkeitsprüfung und somit zum Erlangen einer MHK von Colistin fungiert die Mikrobouillon-Dilution anhand des ISO Standards 20776-1. Die Agardiffusionsmethode sowie die Agargeldiffusionsmethode liefern ungenauere Ergebnisse und sind daher nicht zu empfehlen (67).

4 Material und Methoden

Um eine aktuelle Einschätzung zur Lage der Colistinresistenzen bei *Escherichia coli* und anderen *Enterobacteriaceae* in österreichischen Ferkelaufzuchtbetrieben zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit labordiagnostische Untersuchungen durchgeführt.

4.1 Projektbeschreibung

Um die Hypothesen dieser Arbeit zu bestätigen beziehungsweise zu entkräften, wurden aus einer Anzahl von 50 Ferkelproduktionsbetrieben in Österreich, welche Colistin-haltige Tierarzneimittel rund um das Absetzen der Ferkel einsetzten und von 50 Betrieben, welche kein Colistin beim Absetzen von Ferkeln verwendeten, Stiefeltupfer aus dem Aufzuchtferkelbereich gewonnen. Diese Proben wurden anschließend gestaffelt untersucht. Dafür wurden selektive Nährmedien für die phänotypische Charakterisierung der Colistinresistenz herangezogen. Die colistinresistenten Isolate wurden phänotypisch und genotypisch charakterisiert.

4.2 Versuchsdurchführung

4.2.1 Im Vorfeld durchgeführte Untersuchungen

Die nachfolgenden Arbeitsschritte umfassen die Sammlung des Probenmaterials sowie dessen Aufbewahrung und die weiteren Schritte zur Selektion colistinresistenter Isolate. All jene Tätigkeiten wurden am Institut für Mikrobiologie noch vor Beginn dieser Arbeit durchgeführt.

4.2.1.1 Probensammlung, Aufbewahrung und Selektion

Ursprung der untersuchten Bakterienisolate ist diagnostisches Probenmaterial. Gesammelt wurden Kotproben in Form von Sockentupfern im Rahmen von Betriebsbesuchen der

Universitätsklinik für Schweine und durch Einsendung von praktizierenden Tierärzt:innen die Ferkelproduktionsbetriebe betreuten. Insgesamt wurden Bakterienisolate aus 100 Sockentupfer aus österreichischen Ferkelproduktionsbetrieben sowohl phänotypisch als auch genotypisch untersucht. Die gesammelten Proben wurden anschließend am Institut für Mikrobiologie in Peptonwasser der Firma Merck KGaA angereichert und entweder direkt weiterbearbeitet oder auf -80°C mittels Kryokonservierung asserviert. Bei den nachfolgend bearbeiteten Isolaten handelt es sich um die Proben mit der Bezeichnung TVC 1, TVC 2, TVC2a, TVC2c, RR8, RR10, TB30 und UF13. Als Referenzstämme fungierten *Escherichia coli* ATCC® (American Type Culture Collection) 25922 sowie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853. Zur Selektion colistinresistenter Probenisolate wurde die Anzucht auf colistinhaltigen EMB (Eosin-Methylen-Blau-Agar) durchgeführt.

4.2.1.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mittels GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit der Firma Merck KGaA im Vorfeld durch eine Institutsmitarbeiterin durchgeführt und für diese Diplomarbeit zur Verfügung gestellt. Die Amplifikation der PCR-Produkte wurde im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführt.

4.2.2 Eigens durchgeführte Untersuchungen

Die gewonnenen Proben in Form von Stiefeltupfern wurden nach erfolgter Anreicherung labordiagnostisch bearbeitet. Als erster Schritt wurden am Institut für Mikrobiologie Reinkulturen aus den Sockentupferproben hergestellt und als Grundlage für die weitere Bearbeitung im Rahmen der Diplomarbeit zur Verfügung gestellt.

Die Durchführung erfolgte anhand der 2013 veröffentlichten Empfehlung des CLSI „Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Fourth Edition“ (69). Auch orientiert sich diese Studie an den im Standard „Polymyxin Breakpoints for Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp.“ veröffentlichten klinischen Grenzwerten des CLSI (70).

4.2.3 Anzuchtbedingungen

Die Anzucht der kryokonservierten bereits selektierten Probenisolate sowie der Referenzstämme erfolgte mittels Dreiösenausstrich auf BD MacConkey II Agar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). Dieser sogenannte Verdünnungsausstrich soll die Bildung von Einzelkolonien der Bakterienkultur gewährleisten. Anschließend fand das Wachstum der Isolate bei 37°C unter aeroben Bedingungen über einen Zeitraum von 18-24 Stunden statt.

4.2.4 Empfindlichkeitsprüfung

Zur Empfindlichkeitsprüfung des Probenmaterials gegenüber Colistin wurde ein Bouillon-Mikrodilutionstest gemacht. Weiters wurde diese Arbeit durch die Durchführung der Agardiskdiffusionsmethode in Form von angefertigten Antibiogrammen ergänzt (71).

Hierfür wurden folgende Antibiotika-Testblättchen der Firma Becton Dickinson GmbH mit deren jeweiliger Konzentration verwendet: Amoxicillin-Clavulansäure (20/10 µg), Piperacillin (10 µg), Cefotaxim (30 µg), Ceftazidim (30 µg), Cefoxitin (30 µg), Aztreonam (30 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Gentamicin (10 µg), Tobramycin (10 µg), Amikacin (30 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Trimethoprim-Sulfamethoxazol (1.25/23.75 µg), Tetrazyklin (30 µg), Doxzyklin (30 µg), Chloramphenicol (30 µg) und Fosfomycin (200 µg).

4.2.4.1 Bouillon-Mikrodilutionsmethode

Um die minimale Hemmkonzentration und damit die Empfindlichkeit der Bakterienisolate gegenüber Colistin zu untersuchen, wurde die Bouillon-Mikrodilutionsmethode nach Empfehlungen der CLSI (Stand 2013 VET01-A4) durchgeführt und anhand CLSI Doc M100 interpretiert (69, 72).

Auch bei dieser Empfindlichkeitsüberprüfung wurden zur Qualitätssicherung und um die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse zu gewährleisten, die Referenzstämme miteinbezogen. Für den Referenzstamm *Escherichia coli* ATCC® gelten MHK-Werte für Colistin zwischen 0,25 und 0,2 µg/mL sowie für *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 MHK-Werte zwischen 0,5 und 4 µg/mL.

Die Polymerasenkettenreaktion wurde zur Untersuchung der Bakterienisolate auf die Resistenzgene *mcr 1-9* durchgeführt. Nach erfolgter DNA-Extraktion, die vor Beginn dieser Arbeit am Institut für Mikrobiologie durchgeführt wurde, sowie der Beschriftung der Mikroreaktionsgefäße wurde anschließend der PCR-Ansatz anhand des Laborprotokolls des National Food Institute hergestellt (73). Für die Durchführung der Untersuchungen auf das Vorliegen von *mcr 6-9* wurden international veröffentlichte Artikel herangezogen (74, 75). Die PCR wurde anschließend mit dem Mastercycler® nexus - PCR Thermocycler durchgeführt. Nach Abschluss der Amplifikation folgte die Gelelektrophorese.

4.2.5 Elektrophorese

Das durch die PCR entstandene Amplifikat der jeweiligen extrahierten DNA wurde anschließend durch eine Elektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurden die Banden eines Agarosegels mit 10 µl des jeweiligen Amplifikats geladen. Nach erfolgter Elektrophorese bei 300 Volt für 40-45 Minuten konnte durch die Färbung mit Ethidiumbromid das Bandenmuster der PCR-Amplifikate sichtbar gemacht und in weiterer Folge ausgewertet werden (76).

5 Ergebnisse

5.1.1 Agardiskdiffusionsmethode

Die Auswertung der Antibiogramme hinsichtlich der nachgewiesenen Resistenzen wird anschließend zusammenfassend beschrieben. Bei fünf der sich als phänotypisch colistinresistent dargestellten Isolate konnten weitere Resistenzen gegen Antibiotika anderer Wirkstoffklassen als jene der Polymyxine festgestellt werden. Hierzu zählten Beta-Laktam-Antibiotika, Tetracykline, Nitrofurane, Fosfomycin, Sulfonamid/Trimethoprim und Fluorchinolone.

5.1.2 Bouillon-Mikrodilutionsmethode

Durch die Bouillon-Mikrodilutionsmethode konnten von den durch die gelungene Anzucht auf Colistin-haltigen EMB Agar bereits vorselektierten colistinresistenten Probenisolaten bei sechs der zehn Probenisolaten ein MHK-Wert für das Antibiotikum Colistin von $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ festgestellt werden. Bei jenen Proben handelt es sich um TVC 1, TVC 2a, TVC 2c, RR 8, TB30 sowie UF 13. All jene Probenisolate stammen aus Betrieben, in welchen Colistin zum Einsatz kam. Bei den Isolaten TVC 1, TVC 2, 2a, 2c und UF 13 handelt es sich um *Klebsiella pneumoniae*, welche aus Oberösterreich bzw. aus der Steiermark stammten.

5.1.3 PCR

Die Auswertung der Elektrophorese konnte kein *mcr-1* Gen in *E. coli* Isolaten nachweisen. Somit konnten weder das Resistenzgen *mcr-1*, noch die Gene *mcr 2-9* bei den phänotypisch Colistin-resistenten Bakterienisolaten nachgewiesen werden. Dahingehend konnten durch die spezifische PCR keine Plasmid-vermittelten Resistenzen bei *E. coli* Isolaten nachgewiesen werden. Lediglich in einem *C. freundii* Isolat, das aus einem niederösterreichischen Betrieb stammt, welcher Colistin einsetzte, konnte ein *mcr-4* Gen in den Vorarbeiten dieser Diplomarbeit nachgewiesen werden.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die phäno- sowie genotypische Charakterisierung von *E. coli* Isolaten, um das Auftreten und die Verbreitung des *mcr-1* Gens zu prüfen. Nach erfolgter Selektion der phänotypisch resistenten Isolate, wurden jene Isolate, deren MHK $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ betrug, genotypisch untersucht.

Weder Probenisolate der Gattung *E. coli* mit Ursprung aus einem Ferkelaufzuchtbetrieb mit der Verwendung von Colistin zur Vermeidung von PWD, noch Isolate aus jenen Betrieben, in welchen kein Colistin zum Einsatz kam, wiesen ein *mcr-1* Gen und somit eine Plasmidvermittelte Colistinresistenz auf. Initial wurde ein *E. coli* Isolat in den Vorarbeiten dieser Arbeit als *mcr-1* positiv kategorisiert. Jedoch sei hier erwähnt, dass es sich lediglich um Vorscreenings handelte und die Existenz des *mcr-1* Gens im Rahmen dieser Diplomarbeit bestätigt werden sollte. Abgesehen von einem positiven Nachweis von *mcr-4* bei einem *C. freundii* Isolat aus einem niederösterreichischen Betrieb mit Colistineinsatz zur PWD-Behandlung, konnten in keinem weiteren Fall *mcr1-9* nachgewiesen werden.

Das Gen *mcr-4* konnte erstmalig 2013 in Italien aus *Salmonella enterica* aus dem Serovar Typhimurium eines Schlachtschweines nachgewiesen werden. Das nachgewiesene Isolat mit der Bezeichnung R3445 wies einen anhand Bouillon-Mikrodilutionsmethode ermittelten MHK-Wert für Colistin von 8 mg/L auf. Konjugationsexperimente schlugen fehl, dennoch gelang es dem Forscherteam die DNA des *mcr-4* tragenden Plasmids des *Salmonella enterica* Isolates durch *in vitro*-Experimente auf *E. coli* Zellen zu übertragen. Jene transformierten *E. coli* zeigten einen MHK-Wert von 2 mg/L, welcher achtmal höher war als jener der nicht-transformierten Rezipientenzelle. Das Forscherteam untersuchte des Weiteren *E. coli* Isolate, die innerhalb von Routineuntersuchungen gewonnen wurden. 125 Probenisolate, welche alle von PWD-erkrankten Schweinen stammten, wurden auf *mcr-4* untersucht. 34 *E. coli* Isolate wurden im Jahr 2013 in Italien gesammelt. Aus Spanien stammten 43, aus Belgien 48 Proben, welche jeweils in den Jahren 2015 und 2016 zusammengetragen wurden. 50 von den 125 Isolaten zeigten eine ermittelte MHK von über 2 mg/L. 32 wiederum wurden positiv auf die Anwesenheit von *mcr-1* getestet, 3 auf jene von *mcr-2* und 11 Isolate wiesen dasselbe *mcr-4* Gen auf, welches 2013 in Italien im *Salmonella enterica* Isolat R3445 nachgewiesen wurde. Konjugationsexperimente des *mcr-4* tragenden Plasmids verliefen unter Laborbedingungen positiv, wobei alle Transkonjuganten ein coexistierendes Helferplasmid aufwiesen. Somit

konnte die Existenz des nicht selbstständig konjugierenden *mcr-4* Plasmids bewiesen werden, welches eine Prävalenz von 9% aufweist (77).

Die Hypothese lautete, dass trotz breitflächigem Einsatz von colistinhaltigen Arzneimitteln in der Schweineproduktion, das Auftreten von colistinresistenten *E. coli* gering ist und eine Prävalenz von unter 10% aufweist. Da keine der *E. coli* Isolate, die durch erhöhte MHK-Werte gekennzeichnet waren, genotypisch eine *mcr-1* Existenz aufwiesen, konnten demnach die Untersuchungen im Rahmen dieser Diplomarbeit die Hypothese bestätigen.

Durch die gewonnenen Ergebnisse im Rahmen dieser Diplomarbeit konnte somit erstmalig eine Einschätzung der derzeitigen Resistenzsituation von *E. coli* Isolaten gegenüber Colistin in Ferkelaufzuchtbetrieben in Österreich getroffen werden. Diese Ergebnisse sind nicht nur opportun, um Antibiotikaresistenzen international in Relation setzen zu können, sondern auch sehr bedeutend, um die zukünftigen Resistenzänderungen abzuschätzen und einzuteilen.

Die in Bezug auf Österreich ermittelte Prävalenz der Colistinresistenzen zeigt sich im direkten Vergleich zu anderen europäischen Ländern ähnlich. Hinsichtlich seiner Prävalenzrate liegt Österreich somit im europäischen Durchschnitt. Dies belegt beispielsweise eine Studie, die sich mit dem Auftreten des *mcr-1* Gens innerhalb Europas in den Jahren 2002 bis 2014 auseinandersetzt. Hierfür wurden gesunde Schlachtkörper von Rindern, Hühnern und Schweinen auf Schlachthöfen beprobt und jene Proben in weiterer Folge auf Antibiotikaresistenzen untersucht. Hierbei wiesen 148 der 10.206 *E. coli* Isolate und somit 1,4% einen MHK-Wert von >2mg/L auf. In 0,7% der resistenten Proben konnte in weiterer Folge das *mcr-1* Gen nachgewiesen werden. All diese Proben wurden zwischen 2008 und 2014 gesammelt. Von jenen positiv auf *mcr-1* getesteten Isolaten, stammten 44 (1,2%) von Hühnern und 25 (0,7%) von Schweinen. Zwei der *mcr-1* positiven Proben von Schweinen stammten aus Frankreich, 23 aus Spanien. Während den Jahren 2008 und 2009 zeigte sich die *mcr-1* Prävalenz sehr gering mit einem Wert von 0,5% und nahm anschließend während der Jahre 2013 und 2014 auf 1,7% zu. Das *mcr-1* Gen war demnach mit geringem Aufkommen seit über zwölf Jahren in Europa gegenwärtig (38).

Zwischen 2010 und 2015 wurden im benachbarten Deutschland über 10.600 *E. coli* Isolate im Rahmen eines nationalen Überwachungsprogramm untersucht. 3,8% der analysierten Isolate wiesen das Resistenzgen *mcr-1* auf. Hauptsächlich bedingt wurde diese Rate durch jene Proben, die aus der Geflügelproduktionskette stammten. Jene Isolate, die von Schweinen stammten, legten im Gegensatz zu aus Asien stammenden Daten, wo *mcr-1* positive Isolate

häufig von der Schweineproduktionskette stammten, eine sehr geringe Prävalenz dar. In den Jahren 2011 und 2015 konnten jeweils an Mastschweinebetrieben eine *mcr-1* Rate von 1,5% festgestellt werden, wobei die phänotypisch nachgewiesene Colistinresistenz 2015 bei 2,1% und 2011 bei 3,6% lag. Somit war das Auftreten des Resistenzgens im Jahr 2015 leicht höher einzuordnen. Vermuten lässt die Studie, dass die Prävalenzrate in Deutschland im Vergleich zu anderen europäischen Staaten höher ist, was vermutlich mit den höheren Verkaufszahlen von Polymyxinen innerhalb Deutschlands zusammenhängt. Erste Screening-Verfahren bezüglich des *mcr-1* Aufkommens in Frankreich lieferten Prävalenzwerte von 0,5% in Isolaten von Schweinen und sind demnach ebenso wie die aus Deutschland übermittelten Prävalenzwerte mit jenen gewonnen Erkenntnissen dieser Arbeit bezüglich der sehr geringen Prävalenz des Resistenzgens *mcr-1* äquivalent (78).

Eine Arbeit aus England beschäftigt sich mit dem Auftreten von *mcr-1* tragenden Plasmiden in *E. coli* Isolaten tierischen Ursprungs in Schlachthöfen während der Jahre 2013 bis 2015 und konnte hierbei eine Prävalenz von 0,6% ermitteln (79).

Ein Artikel, der bereits kurz nach dem erstmaligen *mcr-1* Nachweis erschien, setzt ebenso die lokalen variablen Prävalenzraten zueinander in Vergleich. So trugen in Europa beispielsweise im Jahr 2011 als auch im Jahr 2013 weniger als 1% der beprobten Schweine in Frankreich das *mcr-1* Gen. In den Jahren 2012 bis 2014 wurden für China Prävalenzwerte zwischen 14% und 25% ermittelt. Vietnam zeigte für 2014 und 2015 sogar eine Prävalenz von 38% (31).

Das Auftreten von *mcr-1* zeigt sich also geografisch bedingt sehr variabel. So konnte eine Forschungsarbeit, die sich mitunter mit dem Auftreten von *mcr-1* in Südostasien auseinandersetzt, ebenso variable Prävalenzraten ermitteln. 767 *E. coli* Isolate, welche von Schweinen zwischen Oktober 2017 und März 2018 gewonnen wurden, wurden analysiert und das jeweilige Vorkommen des Resistenzgens in Thailand (5,6%), Kambodscha (11,4%), Laos (20,3%) und Myanmar (2,8%) aufzeigt (80).

Eine Untersuchung des *mcr-1* Vorkommens in 18 Provinzen Chinas zwischen Oktober 2016 und September 2017 zeigte Prävalenzen zwischen 45% und 100% (81). Eine andere Studie, die während 2017 und 2018, also nach dem Verbot von Colistin in China durchgeführt wurde, konnte eine abnehmende *mcr-1* Prävalenz klar aufzeigen. Während es in 2016 noch 45% der untersuchten Isolate positiv getestet wurden, waren es 2018 nur noch 19,4% der Isolate (37).

Eine mögliche Erklärung für das nicht nachweisbare *mcr-1* Gen in der vorliegenden Arbeit könnte in der untersuchten Altersgruppe liegen. In dieser Diplomarbeit wurden ausschließlich

Absetz- bzw. Aufzuchtferkel untersucht, wohingegen in der publizierten Literatur vorwiegend Mastschweine untersucht wurden.

Durch das Verbot von Zinkoxid-haltigen Tierarzneimitteln im Juni 2022 ist mit einem Anstieg des Colistinverbrauchs in österreichischen Ferkelaufzuchtbetrieben zu rechnen. Aufgrund dessen ist, mit einem unerwünschten und dementsprechend steigenden Trend des *mcr-1* Vorkommens zu rechnen.

Weltweit können nicht nur geografisch gesehen Unterschiede, sondern auch eine breite Häufigkeitsverteilung innerhalb eines Landes festgestellt werden (52).

Um die tatsächliche Entwicklung der Resistenzlage in Österreich weiterhin einordnen zu können, müssen weitere Untersuchungen hinsichtlich der *mcr-1* Prävalenz in größerem Ausmaß vorgenommen werden. Hierbei empfiehlt sich eine Probennahme mit größerem Stichprobenumfang, sowie flächenübergreifender Beprobung innerhalb Österreichs. Da Colistin fast ausschließlich in der Ferkelaufzucht eingesetzt wird, sollte jedenfalls ein Hauptaugenmerk bei zukünftigen Untersuchungen auf diese Alterskategorie gesetzt werden. Auch sollten Veränderungen, wie der zu erwartende Anstieg der Colistingaben in der Nutztierwirtschaft, insbesondere der Ferkelproduktion aufgrund des kürzlich in Kraft getretenen Verbots von Zinkoxid-haltigen Tierarzneimitteln, miteinbezogen werden. Da Vergleichswerte in Österreich bis zu diesem Zeitpunkt fehlen, ist der internationale Vergleich und die weitere Resistenzentwicklung schwer abschätzbar. Um Limitationen der gewonnenen Ergebnisse weitgehend ausschließen zu können, werden weiterführende standardisierte Untersuchungen der Probenisolate durch ein konstitutionelles Labor (renommiertes Labor/Unternehmen) empfohlen. Auch eine stichprobenartige dauerhafte Untersuchung im Rahmen eines Routine-Überwachungsprogramms wäre denkbar. Die AGES, die als verantwortliche behördliche Institution fungiert, sollte zur systematischen Erhebung der Resistenzlage bei Bakterien im Rahmen der Vorgaben der Europäischen Union zukünftig neben den Proben aus Mastschweinen auch Ferkelproduktionsbetriebe in das Monitoring zur Erhebung von *mcr*-vermittelter Resistenz gegen Colistin miteinschließen. Auch wären Untersuchungen hinsichtlich der Übertragung und Ausbreitung der *mcr-1* tragenden Plasmide in der Umgebung betroffener Schweinebetriebe denkbar, wie diese bereits in Deutschland durchgeführt wurden (48). Ein denkbare Szenario wäre, bei Betrieben in welchen *mcr*-vermittelte Colistinresistenz in Bakterienisolaten nachgewiesen wurde, auch die Umweltproben, z.B. aus Gülle, Misthaufen oder Abluft zu untersuchen.

Ein weiterer bedeutender empfehlenswerter Ansatz wäre es, aufgrund der aktuellen Forschungsergebnisse, ebenso weitere *mcr*-Plasmide in die Überwachung miteinzubeziehen. Somit sollten nicht nur das weitverbreitete *mcr-1* Gen, sondern vor allem das innerhalb Europas nachgewiesene *mcr-4*, sowie das weniger häufig in Belgien von Probenisolaten von Schweinen und Rindern nachgewiesene *mcr-2*, als auch das in *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella* innerhalb der USA und Asien entdeckte *mcr-3* Plasmid berücksichtigt werden (52, 77, 82, 83). Dies bezieht sich in Folge insbesondere auf jene Plasmide, die bereits in Europa nachgewiesen wurden. Dabei handelt es sich um *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6* und *mcr-10* (52).

Um die Wichtigkeit sowie die Unverzichtbarkeit von antibiotisch wirksamen Substanzen abschließend erneut hervorzuheben, sollten nicht nur weitere Untersuchungen länderübergreifend zur Informationssicherung der Resistenzsituation gegen Colistin unternommen werden, sondern auch auf weitere umfassende Beschränkungen zur Vermeidung des exzessiven Antibiotikaeinsatzes nicht verzichtet werden, ganz im Sinne des „One health“-Ansatzes.

7 Literatur

1. One Health; 2023 [Stand: 17.01.2023]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health>.
2. RKI - Antibiotikaresistenz - One Health; 2023 [Stand: 20.01.2023]. Verfügbar unter: <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/One-Health/One-Health-tab-gesamt.html>.
3. Kyung-Hyo D, Jae-Won B, Wan-Kyu L. Antimicrobial Resistance Profiles of Escherichia coli from Diarrheic Weaned Piglets after the Ban on Antibiotic Growth Promoters in Feed. Antibiotics (Basel) 2020; 9(11). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33138321/>.
4. Der G-BA stuft drei Arzneimittel als Reserveantibiotika ein - Gemeinsamer Bundesausschuss; 2023 [Stand: 20.01.2023]. Verfügbar unter: <https://www.g-ba.de/presse/pressemitteilungen-meldungen/1016/>.
5. wir-sind-tierarzt.de. Colistin künftig Reserveantibiotikum?; 2016 [Stand: 20.01.2023]. Verfügbar unter: <https://www.wir-sind-tierarzt.de/2016/01/colistin-auf-die-liste-der-reserveantibiotika/>.
6. Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, Garcia-Fernandez A, Pollini S et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. Euro Surveill 2014; 19(42). Verfügbar unter: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.42.20939>.
7. Kraml B. Aus für Zink: Was hilft noch gegen Absatzdurchfall? top agrar Österreich 28.04.2022 [Stand: 20.01.2023]. Verfügbar unter: <https://www.topagrar.com/oesterreich/schwein/news/aus-fuer-zink-was-hilft-noch-gegen-absetzdurchfall-13068229.html>.
8. Anghelescu I. Verbot für Zinkoxid in 2022: Welche Alternativen gibt es?; 2022 [Stand: 20.01.2023]. Verfügbar unter: <https://ew-nutrition.com/de/verbot-fur-zinkoxid-in-2022-welche-alternativen-gibt-es/>.
9. Neues Colistin-Resistenzgen mcr-1 in Deutschland nachgewiesen • Institut für Tier- und Umwelthygiene, ITU • Fachbereich Veterinärmedizin; 2023 [Stand: 20.01.2023]. Verfügbar

unter: https://www.vetmed.fu-berlin.de/einrichtungen/institute/we10/News-_-Stellenangebote/mcr-1-in-RESET-gefunden.html.

10. Redaktion V. Durchfallerkrankungen bei Schweinen. Schlütersche Fachmedien GmbH Mo., 15.06.2020 [Stand: 20.01.2023]. Verfügbar unter: <https://www.vetline.de/durchfallerkrankungen-bei-schweinen>.
11. Reiner G. Krankes Schwein - kranker Bestand. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; 2015. (UTB Veterinärmedizin; Bd. 8646).
12. Diseases of Swine; 2023 [Stand: 22.03.2023]. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.vetmeduni.ac.at/doi/epub/10.1002/9781119350927>.
13. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand* 2017; 59(1):31. Verfügbar unter: <https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-017-0299-7>.
14. Die Faktoren eines gesunden Stallklimas für Schweine; 2023 [Stand: 02.05.2023]. Verfügbar unter: <https://www.vostermans.com/de/ventilation/blog/die-faktoren-eines-gesunden-stallklimas-f%C3%BCr-schweine>.
15. Absetzferkel müssen fressen; 2023 [Stand: 06.11.2023]. Verfügbar unter: [Web] <https://www.schaumann.at/managementtipps-244/c/absetzferkel-mussen-fressen-2614>.
16. Deutsche Tiernahrung Cremer. Ferkel richtig absetzen: So gelingt's!; 2023 [Stand: 06.11.2023]. Verfügbar unter: [Web] <https://www.deuka.de/aktuelles/ferkel-richtig-absetzen-so-gelingts/>.
17. Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 9th ed. 2020. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Springer; 2020.
18. Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P. Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: [Immunologie, Hygiene, Infektiologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie]. 12., überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme; 2010.
19. Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SH, Schulz TF, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.

20. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S. *Pharmakologie und Toxikologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
21. Groß U. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*: 238 Abbildungen, 129 Tabellen. 2. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2009.
22. Bernreiter-Hofer T, Schwarz L, Müller E, Cabal-Rosel A, Korus M, Misic D et al. The Pheno- and Genotypic Characterization of Porcine *Escherichia coli* Isolates. *Microorganisms* 2021; 9(8):1676. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/8/1676>.
23. Abraham G. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 4., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2016.
24. Gharaibeh MH, Shatnawi SQ. An overview of colistin resistance, mobilized colistin resistance genes dissemination, global responses, and the alternatives to colistin: A review. *Veterinary World* 2019; 12(11):1735–46. Verfügbar unter: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85075569450&doi=10.14202%2fvvetworld.2019.1735-1746&partnerID=40&md5=a4f168764cf70dfabbc650141a4d6de1>.
25. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms* 2020; 8(11). doi: 10.3390/microorganisms8111716.
26. Li B, Yin F, Zhao X, Guo Y, Wang W, Wang P et al. Colistin Resistance Gene *mcr-1* Mediates Cell Permeability and Resistance to Hydrophobic Antibiotics. *Frontiers in microbiology* 2019; 10:3015. doi: 10.3389/fmicb.2019.03015.
27. Herdegen T. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. 4. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2020. (Kurzlehrbuch).
28. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Frontiers in microbiology* 2016; 7:1789. doi: 10.3389/fmicb.2016.01789.
29. Wirkstoff: Colistin - Pharmakologie; 2023 [Stand: 23.05.2023]. Verfügbar unter: https://www.vetpharm.uzh.ch/Wirkstoffe/000000000106/6177_02.html.
30. Brodt H-R, Smollich M. *Antibiotika-Therapie: Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung*. 12., komplett überarb. und erweiterte Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2013.

31. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill* 2016; 21(9):30155. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155.
32. de. Colistin – die wechselhafte Geschichte eines Antibiotikums [Stand: 30.05.2023]. Verfügbar unter: <https://www.wir-sind-tierarzt.de/2016/01/colistin-geschichte-eines-antibiotikums/>.
33. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/11/1716>.
34. Wales AD, Davies RH. Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics (Basel)* 2015; 4(4):567–604. doi: 10.3390/antibiotics4040567.
35. Anjum MF, Duggett NA, AbuOun M, Randall L, Nunez-Garcia J, Ellis RJ et al. Colistin resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from a pig farm in Great Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016; 71(8):2306–13. doi: 10.1093/jac/dkw149.
36. Burow E, Rostalski A, Harlizius J, Gangl A, Simoneit C, Grobbel M et al. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Preventive Veterinary Medicine* 2019; 165:52–62. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587718306457>.
37. Valiakos G., Kapna I. Colistin Resistant *mcr* Genes Prevalence in Livestock Animals (Swine, Bovine, Poultry) from a Multinational Perspective. A Systematic Review. *Veterinary Sciences*. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34822638/>.
38. El Garch F, Jong A de, Bertrand X, Hocquet D, Sauget M. *mcr-1*-like detection in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from food-producing animals at slaughter in Europe. *Veterinary microbiology* 2018; 213:42–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.014.
39. Curcio L, Luppi A, Bonilauri P, Gherpelli Y, Pezzotti G, Pesciaroli M et al. Detection of the colistin resistance gene *mcr-1* in pathogenic *Escherichia coli* from pigs affected by post-weaning diarrhoea in Italy. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2017; 10:80–3. doi: 10.1016/j.jgar.2017.03.014.
40. Hille K, Roschanski N, Ruddat I, Woydt J, Hartmann M, Rösler U et al. Investigation of potential risk factors for the occurrence of *Escherichia coli* isolates from German fattening

- pig farms harbouring the *mcr-1* colistin-resistance gene. International journal of antimicrobial agents 2018; 51(2):177–80. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.08.007.
41. Kieffer N, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. High Rate of MCR-1-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Pigs, Portugal. Emerg Infect Dis 2017; 23(12):2023–9. doi: 10.3201/eid2312.170883.
 42. Laurent Poirel, Jean-Yves Madec, Agnese Lupo, Anne-Kathrin Schink, Nicolas Kieffer, Patrice Nordmann et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. Microbiology Spectrum 2018; 6(4):6.4.14. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.
 43. Aguirre L, Vidal A, Seminati C, Tello M, Redondo N, Darwich L et al. Antimicrobial resistance profile and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), AmpC beta-lactamases and colistin resistance (*mcr*) genes in *Escherichia coli* from swine between 1999 and 2018. Porcine Health Management 2020; 6:8. doi: 10.1186/s40813-020-00146-2.
 44. mikula. 201811a_AntibiotokaLL_Beilage [Stand: 31.05.2023]. Verfügbar unter: https://www.ris.bka.gv.at/Dokumente/Avn/AVN_20181129_AVN_2018_11a_2/201811a_AntibiotokaLL_Beilage.pdf.
 45. Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 9., völlig überarb. u. erw. Auflage 2020. Berlin: Springer Berlin; Springer; 2020. (Lehrbuch).
 46. Falgenhauer L, Waezsada S-E, Yao Y, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U et al. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. The Lancet Infectious Diseases 2016; 16(3):282–3. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00009-8.
 47. Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2016; 71(8):2066–70. doi: 10.1093/jac/dkw274.
 48. Guenther S, Falgenhauer L, Semmler T, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Roesler U et al. Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2017; 72(5):1289–92. doi: 10.1093/jac/dkw585.
 49. Insertionselemente; 2018 [Stand: 28.11.2022]. Verfügbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/insertionselemente/34216>.

50. Veldman K, van Essen-Zandbergen A, Rapallini M, Wit B, Heymans R, van Pelt W et al. Location of colistin resistance gene *mcr-1* in Enterobacteriaceae from livestock and meat. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016; 71(8):2340–2. doi: 10.1093/jac/dkw181.
51. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* 2016; 16(2):161–8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
52. Hussein NH, Al-Kadmy IMS, Taha BM, Hussein JD. Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Mol Biol Rep* 2021; 48(3):2897–907. doi: 10.1007/s11033-021-06307-y.
53. European expert group proposes reduction of use in animals of last resort antibiotic colistin to manage risk of resistance | European Medicines Agency; 2023 [Stand: 01.06.2023]. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/news/european-expert-group-proposes-reduction-use-animals-last-resort-antibiotic-colistin-manage-risk>.
54. Informationen zur Antibiotikaresistenz in Österreich; 2023 [Stand: 01.06.2023]. Verfügbar unter: <https://www.sozialministerium.at/Themen/Gesundheit/Antimikrobielle-Resistenzen/AURES---der-%C3%B6sterreichische-Antibiotikaresistenz-Bericht.html>.
55. Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014; 69(3):827–34. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24216767/>.
56. Hain C. Resistenzbericht Österreich AURES 2020. Verfügbar unter: [https://www.sozialministerium.at/dam/jcr:f7ec05de-3c8d-4a4c-b077-98708f138a58/AURES_2020_\(Stand_24.3.2022\).pdf](https://www.sozialministerium.at/dam/jcr:f7ec05de-3c8d-4a4c-b077-98708f138a58/AURES_2020_(Stand_24.3.2022).pdf).
57. Denise S. BERICHT ÜBER DEN VERTRIEB VON ANTIBIOTIKA IN DER VETERINÄRMEDIZIN IN ÖSTERREICH 2016–2020 [Stand: 01.07.2023]. Verfügbar unter: <https://www.ages.at/download/sdl-eyJ0eXAiOiJKV1QiLCJhbGciOiJIUzI1NiJ9.eyJpYXQiOiJlMk0NTkyMDAsImV4cCI6ND A3MDkwODgwMCwidXNlciI6MCwiZ3JvdXBzIjpbMCwtMV0sImZpbGUiOiJmaWxIYWRTa W4vQUdFU18yMDIyLzNfVEIFUi9UaWVvYXJ6bmVpbWl0dGVsX0hvcml1bmlUvQW50a WJpb3Rpa2EtVmVydHJpZWJzbWVuZ2VuX2luX2Rlcl9WZXRlcmluXHUwMGU0cm1lZGI>

6aW4vTWWuZ2VuYmVyaWNodF8yMDIwLnBkZilzInBhZ2UiOjl0MzZ9.rFFR6q8h2AxPU
wNj9HAE9JoNetpGRI5_Y6eSMoxXwco/Mengenbericht_2020.pdf.

58. AGES. AGES - Antibiotika-Vertriebsmengen in der Veterinärmedizin in Österreich; 2022 [Stand: 17.11.2022]. Verfügbar unter: <https://www.ages.at/tier/tierarzneimittel-hormone/antibiotika-vertriebsmengen-in-der-veterinaermedizin>.
59. European Medicines Agency. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020. Verfügbar unter: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2019-2020-trends-2010-2020-eleventh_en.pdf.
60. Wales AD, Davies RH. Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics (Basel)* 2015; 4(4):567–604. doi: 10.3390/antibiotics4040567.
61. European Medicines Agency. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health.
62. EMA. Advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals (colistin) following the recent discovery of the first mobile colistin resistance gene (mcr-1) - Call for scientific data for the update of advice; 2016.
63. Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA.
64. Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis* 2016; 16(3):293. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00061-X.
65. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019.
66. Miguela-Villoldo P, Moreno MA, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Hernández M, Serrano T et al. Longitudinal study of the mcr-1 gene prevalence in Spanish food-producing pigs from 1998 to 2021 and its relationship with the use of polymyxins. *Porcine Health Management* 2022; 8(1). Verfügbar unter: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

85126773806&doi=10.1186%2fs40813-022-00255-0&partnerID=40&md5=a3372bce555384e04c7aaed1398ffd1b.

67. 2008, ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. eucast: EUCAST statutes; 2022 [Stand: 22.09.2022]. Verfügbar unter: <https://www.eucast.org/eucaststatutes>.
68. Clinical & Laboratory Standards Institute. About Us; 2022 [Stand: 22.09.2022]. Verfügbar unter: <https://clsi.org/about/>.
69. CLSI. VET01-A4: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Fourth Edition [Stand: 20.06.2023]. Verfügbar unter: https://clsi.org/media/1531/vet01a4_sample.pdf.
70. mr01ed2_sample [Stand: 06.11.2023]. Verfügbar unter: https://clsi.org/media/3634/mr01ed2_sample.pdf.
71. vet03ed2_sample [Stand: 22.08.2023]. Verfügbar unter: https://clsi.org/media/3648/vet03ed2_sample.pdf.
72. M100 PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 33RD EDITION, M100ED33. 33rd edition. [S.I.]: CLSI; 2023.
73. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Euro Surveill* 2018; 23(6). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672.
74. Yang F, Shen C, Zheng X, Liu Y, El-Sayed Ahmed MAE-G, Zhao Z et al. Plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from market retail fruits in Guangzhou, China. *Infect Drug Resist* 2019; 12:385–9. doi: 10.2147/IDR.S194635.
75. Malorny B. Development of a Novel mcr-6 to mcr-9 Multiplex PCR and Assessment of mcr-1 to mcr-9 Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011–2018) in Germany.
76. Bianca Benker und Olivia Mariel Grünzweil. Nachweis von Antibiotikaresistenz-, Virulenz-, Biozidresistenz- und Metallresistenzgenen in Methicillin-resistenten koagulasenegativen Staphylokokken (MRCoNS) aus Begleittieren [Diplomarbeit]: Veterinärmedizinische Universität Wien.

77. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* 2017; 22(31):30589. Verfügbar unter: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>.
78. Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen B-A, Grobbel M, Skladnikiewicz-Ziemer T, Thomas K et al. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from Livestock and Food in Germany, 2010-2015. *PLoS One* 2016; 11(7):e0159863. doi: 10.1371/journal.pone.0159863.
79. Duggett NA, Sayers E, AbuOun M, Ellis RJ, Nunez-Garcia J, Randall L et al. Occurrence and characterization of *mcr-1*-harbouring *Escherichia coli* isolated from pigs in Great Britain from 2013 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016; 72(3):691–5. doi: 10.1093/jac/dkw477.
80. Lay KK, Jeamsripong S, Sunn KP, Angkittrakul S, Prathan R, Srisanga S et al. Colistin Resistance and ESBL Production in *Salmonella* and *Escherichia coli* from Pigs and Pork in the Thailand, Cambodia, Lao PDR, and Myanmar Border Area. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10(6). doi: 10.3390/antibiotics10060657.
81. Tong H, Liu J, Yao X, Jia H, Wei J, Shao D et al. High carriage rate of *mcr-1* and antimicrobial resistance profiles of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolates in swine faecal samples collected from eighteen provinces in China. *Veterinary microbiology* 2018; 225:53–7. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.09.018.
82. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging Microbes & Infections* 2020; 9(1):508–16. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7067168/>.
83. PubMed Central (PMC). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*; 2023 [Stand: 24.10.2023]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7067168/>.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vertriebsmengen in Tonnen nach Wirkstoffgruppen in der Veterinärmedizin von 2017-2021 in Österreich (60)	23
Abbildung 2: Colistinverbrauch im stationären Bereich im Jahr 2011, 2018-2020 in DDD/1000 Einwohner pro Tag (59)	23
Abbildung 3: Änderungen im Verkauf der Wirkstoffgruppen mit „höchster Priorität in der Humanmedizin“ in EU-Ländern in der Veterinärmedizin von 2011-2020 (62).....	25
Abbildung 4: Änderungen im Verkauf von Polymyxinen in mg/PCU für die Anwendung bei Lebensmittel-liefernden Tieren in EU-Ländern von 2010-2020 (62)	26
Abbildung 5: Polymyxinkonsum von Menschen und Lebensmittel-liefernden Tieren in 29 EU-Ländern im Jahr 2017(66).....	29
Abbildung 6: Zusammenhang zwischen dem Verkauf von Polymyxinen zur Anwendung an Lebensmittel-liefernden Tieren in mg/kg estimated biomass und der Wahrscheinlichkeit von Polymyxinresistenzen in E. coli in Lebensmittel-liefernden Tieren (66)	30
Abbildung 7: mcr-1 Nachweise sowie Verkaufszahlen von Polymyxinen in der Veterinärmedizin in Spanien von 2010 bis 2020 (69)	33

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vertriebsmengen der Polymyxine in der Veterinärmedizin von 2017-2021 in Österreich (62).....	22
---	----