



Untersuchungen zum Vorkommen Carbapenem-resistenter Enterobakterien in deutschen Nutztierhaltungen und deren molekularbiologische Charakterisierung



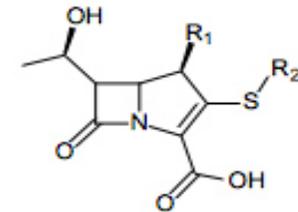
Nicole Roschanski, Jennie Fischer, Anika Friese, Annemarie Käsbohrer, Lothar Kreienbrock,
Yvonne Pfeifer, Beatriz Guerra und Uwe Rösler

Carbapeneme & Carbapenemases bildende Enterobakterien

- Carbapeneme gehören zur Gruppe der Breitband- β -Laktam Antibiotika
- **Reserveantibiotikum** zur Behandlung schwerwiegender humanmedizinischer Infektionskrankheiten (WHO, 2011)



Zunehmende Verbreitung von Carbapenem-Resistenzen verursacht schwerwiegende Probleme!



Carbapeneme

http://www.pharmawiki.ch/wiki/media/Carbapeneme_2.png

Erste Funde VIM-1 synthetisierender Enterobakterien in Schweinemast - & Masthähnchenbeständen (Fischer et al., 2012/13) sorgten für Aufsehen und die Forderung nach CPE-Monitorings in Nutztierbeständen (EFSA, 2013).

Rückblick: WAS wurde WO gefunden?

Bisher wurden Funde von drei VIM-1 produzierende *Salmonella enterica* und zwei *E. coli* Isolaten in deutschen Nutztierhaltungen beschrieben:

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dks108
Escherichia coli producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm
Jennie Fischer¹, Irene Rodríguez¹, Silvia Schmoger¹, Anika Friese², Uwe Roesler², Reiner Helmuth¹ and Beatriz Guerra^{1*}

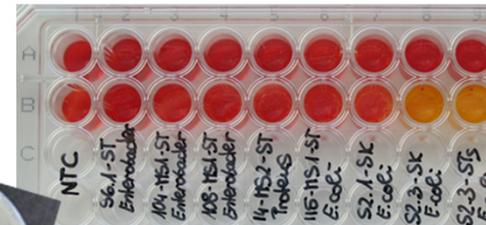
J Antimicrob Chemother 2013
doi:10.1093/jac/dks393
Advance Access publication 2 October 2012
Salmonella enterica subsp. enterica producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms
Jennie Fischer¹, Irene Rodríguez¹, Silvia Schmoger¹, Anika Friese², Uwe Roesler², Reiner Helmuth¹ and Beatriz Guerra^{1*}

Isolat	Spezies	Ursprung
R3	<i>S. enterica</i>	Geflügelfarm 1(G1) - Staub
R25	<i>S. enterica</i>	100m außerhalb von Schweinemastbetrieb 1 (S1)
R27	<i>S. enterica</i>	Schweinemastbetrieb 2 (S2) - Kot
R29	<i>E. coli</i>	Schweinemastbetrieb 2 (S2) - Sammelkot
R178	<i>E. coli</i>	Schweinemastbetrieb 2(S2) - Sockentupfer

Wie ging es weiter?



Stand der weiterführenden Untersuchungen ...



1.) Untersuchung Schweinemastbetriebe (Probenahmen: 2011 – 2013)

Part 1: Tier- und Umwelthygiene

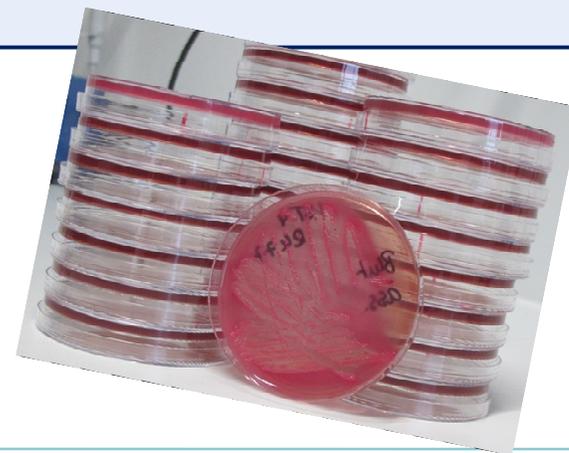


Querschnittsuntersuchung (deutschlandweit):

- Asservierte Mischkulturen von 238 Sockentupfern und Sammelkot von **58 Schweinemastbetrieben**
- Untersuchung auf CRE - allgemein

Detektion Carbapenem-resistenter Enterobakterien

- Nicht-selektive Voranreicherung
- Selektive Kultivierung (*MacConkey Agar-Platten* +0.125 µg/ml Meropenem oder LB + 1µg/ml Imipenem), (EFSA, 2013)
- Speziesidentifikation mittels MALDI-TOF MS
- Phänotypische und genotypische Charakterisierung der Isolate



Ergebnisse Part 1: Querschnittsuntersuchung

Enterobakterien, welche in der Lage waren auf MC + 0.125 µg/ml Meropenem zu wachsen:

Betrieb	Region	Ursprung	Isolate	Species
2	Ost	Sockentupfer	S2-1	<i>E. coli</i>
		Sammelkot	S2-2	<i>E. coli</i>
		Sammelkot	S2-3	<i>E. coli</i>
115	Ost	Sockentupfer	S115	<i>E. coli</i>
6	Ost	Sockentupfer	S6	<i>Enterobacter</i>
104	Nord-West	Sockentupfer	S104	<i>Enterobacter</i>
108	Nord-West	Sockentupfer	S108	<i>Enterobacter</i>
14	Mitte	Sockentupfer	S14	<i>P. penneri</i>

according to CLSI - **resistant**

according to CLSI - **intermediate**

EFSA: "Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems" (2013)
 "...diameters of **25 mm for meropenem**, **23 mm for imipenem**, and **25 mm for ertapenem** would be indicative of non-susceptibility to carbapenems..."

Genotypische Untersuchung

- PCR-Nachweis zur Detektion der Carbapenemasen:

VIM, NDM, KPC, GES, OXA-48 & IMP



Betrieb	Isolat	Spezies
2	S2-1	<i>E. coli</i>
	S2-2	<i>E. coli</i>
	S2-3	<i>E. coli</i>
115	S115	<i>E. coli</i>
6	S6	<i>Enterobacter</i>
104	S104	<i>Enterobacter</i>
14	S14	<i>P. penneri</i>

VIM-positiv!

Weiterführende Untersuchungen...

Gründe für die reduzierte Carbapenem-Sensitivität
bzw. Carbapenem-Resistenz der übrigen Isolate???

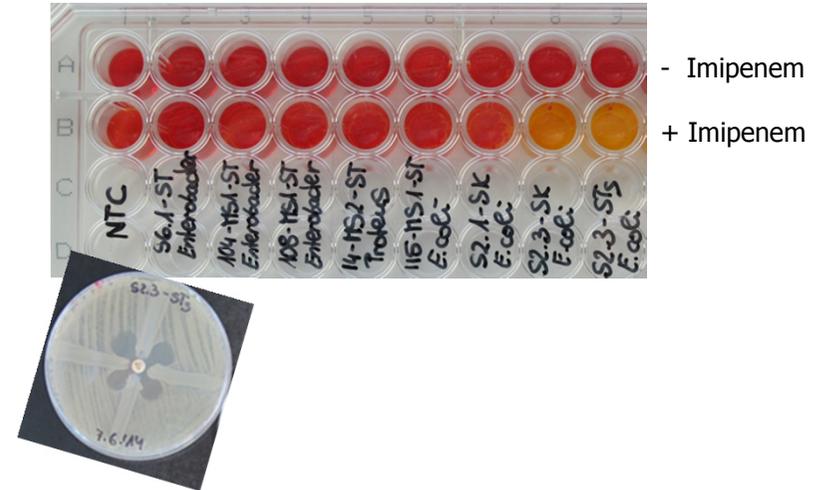


Weiterführende Untersuchungen...

Sind andere Carbapenemasen vorhanden...?

- Carba-NP test (Nordmann et al., 2012) &
- Modified Hodge Test (Lee et al., 2001)

➔ VIM-exprimierende Isolate positive!



Efflux pump vermittelte Carbapenem-Resistenz...?

- Vergleich der Hemmhofdurchmesser in Ab- und Anwesenheit des Efflux-pump inhibitors CCCP (Carbonyl-Cyanide-m-chlorophenylhydrazone), (Wozniak et al., 2012)

➔ Keine Unterschiede erkennbar!

Weiterführende Untersuchungen...

- Porin-Modifikation/-Verlust in Kombination mit ESBL-/AmpC-Expression?

Isolat	Spezies (Phylogr.)	Beta-Laktamasen	Omp-Modifikation
S2-3	<i>E. coli</i> (A)	<i>bla</i> _{CTX-M1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{ampCchrom}	Mutationen in OmpC-/ F- Sequenz
S115	<i>E. coli</i> (A)	<i>bla</i> _{CTX-M1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{ampCchrom}	Verlust OmpC

Ergebnisse Part 2: Systematische Untersuchung der VIM-1 positiven Betriebe

Betrieb	Anzahl der untersuchten Isolate	Anzahl VIM-1 positiver Isolate (Ursprung)
S1	61	1 (100m außen)
S2	104	38 (Kot, Sockentupfer Stall, Gülle, Fliege)

- Im Rahmen weiterer Untersuchungen konnte auf einem weiteren Betrieb eine VIM-positive *S. enterica* Serovar Infantis identifiziert werden
- Auch dieser Betrieb wurde in die systematische Untersuchung eingeschlossen...

Wiederholungsbesuch „S2“ im Juli 2015...

- Beprobt wurden alle 10 Ställe
- Genommene Proben je Stall:
 - 50 einzelne Kothaufen (5 Pools a 10 Kothaufen)
 - 2 Sockentupfer
 - 1 Sammelstaub

Bearbeitung:

- Nicht selektive Voranreicherung
- Selektive Kultivierung auf:
 - a) MacConkey Agar-Platten + 0.125 µg/ml Meropenem
 - b) chrom ID CARBA SMART (Biomerieux)



Ergebnis:

- **KEIN Nachweis Carbapenem-resistenter Enterobakterien!!!**

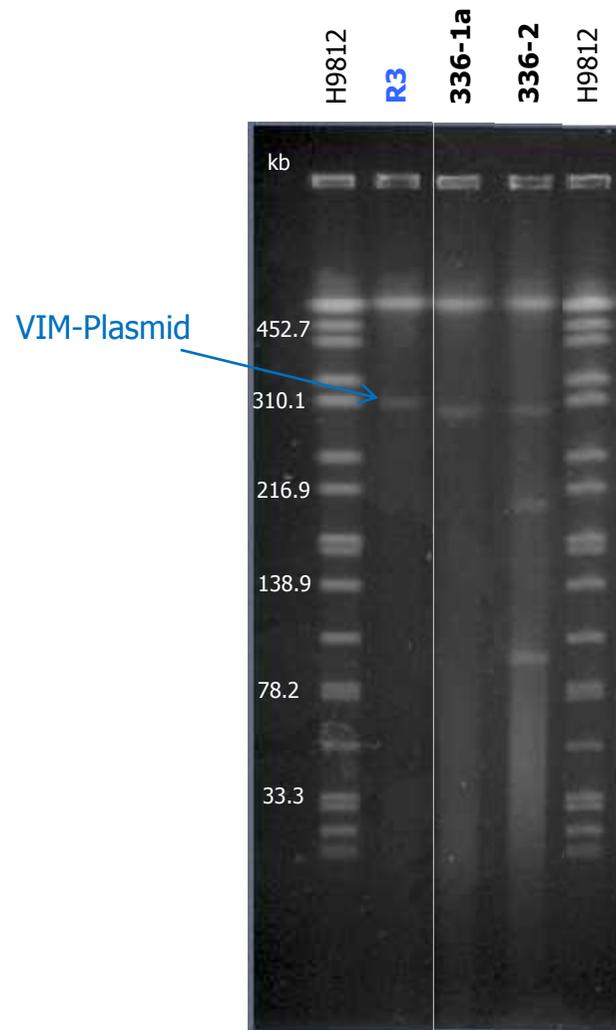
2.) Untersuchung Hähnchenmastbetriebe (Probenahmen: 2011 – 2013)

- Bisher beschrieben wurde eine *S. enterica* Serovar Infantis (R3) aus einer Sammelstaubprobe von Betrieb G1
- Die Untersuchung weiterer asservierter Isolate läuft derzeit...
- **Aktueller Ergebnisstand :**

Betrieb	Isolat	Ursprung	Spezies	Beta-Laktamasen
G1	R3	Staub	<i>S. enterica</i> Serovar Infantis	<i>bla</i> _{VIM-1} , <i>bla</i> _{acc-1}
G78	336-1a	Staub	<i>Salmonella</i> Subsp. I Rauhform	<i>bla</i> _{VIM-1} , <i>bla</i> _{acc}
	336-2		<i>E. coli</i> (B ₂)	<i>bla</i> _{VIM-1} , <i>bla</i> _{acc} , <i>bla</i> _{CMY-2}



S1-PFGE der VIM-positiven Geflügelisolate...



Die weiterführende Charakterisierung der Isolate ist in Arbeit...

Zusammenfassung

- Im Zeitraum 2011 bis 2013 wurden in/ in der Umgebung einzelner deutscher Nutztierhaltungen VIM-positive Enterobakterien gefunden
- Eine gründliche Reinigung- und Desinfektion der Ställe kann eine Ausbreitung/ Übertragung der Bakterien verhindern
- Bei Untersuchungen auf Basis von Sammelkot und Sockentupfern werden einzelne positive Tiere u.U. nicht identifiziert
- Neben den CPEs wurden weitere Enterobakterien mit einer reduzierten Carbapenem-Sensitivität bzw. Resistenz gegen einzelne Carbapeneme detektiert

➔ **Monitoring Programme sind notwendig um das Auftreten Carbapenem-resistenter Bakterien zu erkennen und einer weiteren Verbreitung entgegenwirken zu können!**

Mein besonderer Dank gilt:

- Unseren Projektpartnern vom **BfR** (IP1+2), der **TiHo Hannover** (IP6) und dem **RKI** (IP5) für die ausgezeichnete Zusammenarbeit



- **Christina v. Salviati-Claudius, Henriette Laube** und **Johanna Hering** für das Sammeln der Proben
- **Istvan Szabo** (BfR) für die Serotypisierung der Geflügelsalmonellen
- **Sebastian Günther** (FU-Berlin) und **Martin Kaase** (RUB) für die Bereitstellung von PCR-Positivkontrollen
- **Dem gesamten Team des ITU für die tatkräftige Unterstützung!**

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!