

Nationales Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger
in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie
Ruhr-Universität Bochum, D-44780 Bochum



**Nationales Referenzzentrum
für gramnegative Krankenhauserreger**

Prof. Dr. med. Sören Gatermann
Institut für Hygiene und Mikrobiologie
Abteilung für Medizinische Mikrobiologie
Gebäude MA 01 Süd / Fach 21
Universitätsstraße 150 / D-44780 Bochum
Tel.: +49 (0)234 /32-26467
Fax.:+49 (0)234 /32-14197

Dr. med. Agnes Anders
Dr. rer. nat. Niels Pfennigwerth
Tel.: +49 (0)234 / 32-26938
Fax.:+49 (0)234 /32-14197
nrz@ruhr-uni-bochum.de

14. Oktober 2020 GAL/Ku

Auswertung der „Hähnchenstudie“ Germanwatch, Aug-Sep. 2020

Proben

Die Proben wurden von Germanwatch zur Verfügung gestellt. Es handelte sich meist um originalverpackte Handelsware, hinzu kamen Proben eines Werksverkaufes. Die Proben waren entweder gekühlte Ware oder tiefgefroren. Zur Qualitätssicherung wurde ein Minimum-Maximum-Thermometer in den Transportbehälter eingebracht.

Die Proben waren von Germanwatch nach einem abgesprochenen Schema nummeriert und wurden bei Ankunft im Labor auf Schäden oder Zeichen von Transportproblemen überprüft, fotografiert und ggf. aufgetaut, bevor sie verarbeitet wurden.

Bearbeitung

Details der Methodik finden sich am Ende dieses Textes.

Die Kultivierung schloss eine semiquantitative Bestimmung der Keimbelastung ein. Die Proben wurden auf Selektivmedien (solche, die selektiv bestimmte, auch resistente Organismen nachweisen) und auf Universalnährmedien (solche, die eine große Anzahl unterschiedlicher Organismen nachweisen) ausgebracht. Angezüchtete Mikroorganismen wurden mit Hilfe des MALDI-TOF (Nachweis und Differenzierung der Proteinspektren der Mikroorganismen) identifiziert und, wenn es sich um mögliche humanpathogene Mikroorganismen handelte, auf Antibiotikaresistenzen überprüft.

Es wurde insbesondere nach Enterobakterien, Campylobacter, Salmonellen, Staphylococcus aureus und Enterokokken gesucht. Salmonellen, Campylobacter und S. aureus sind Erreger

von Durchfallserkrankungen und *Campylobacter* und *S. aureus* zeigen häufiger Antibiotikaresistenzen. Bei Enterobakterien kommen eine Vielzahl unterschiedlicher Resistenzen vor (ESBL, Carbapenemase, Fluorocholonresistenz, Colistinresistenz) und sie können insbesondere bei geschwächten Personen auch schwere Erkrankungen hervorrufen. Bei Enterokokken werden Resistenzen gegen Vancomycin, einem Reserveantibiotikum, häufiger beobachtet.

Für Enterobacterales (auch Enterobakterien genannt, Darmbewohner bei Mensch und Tier sowie in der Umgebung vorkommend) wurde Resistenz gegen solche Antibiotika geprüft, die typische bei schwereren Infektionen zum Einsatz kommen. Diese waren

- Piperacillin (ein Acylaminopenicillin)
- Cefotaxim (ein Cephalosporin der Gruppe 3a)
- Ceftazidim (ein Cephalosporin der Gruppe 3b)
- Imipenem (ein Carbapenem)
- Ertapenem (ein anderes Carbapenem)
- Ciprofloxacin (ein Fluorochinolon)

Die Antibiotika Piperacillin, Ceftazidim bzw. Cefotaxim, Imipenem und Ciprofloxacin werden für die in Deutschland gültige Klassifizierung der Mehrfachresistenz nach MRGN verwendet. Ertapenem wurde hinzugenommen, da es im Vergleich zu Imipenem eine höhere Sensitivität für die Erkennung von Carbapenemasen hat. Für Ciprofloxacin gibt es ein mögliches Testergebnis, das eine eindeutige Zuordnung zu resistent oder sensibel nicht zulässt. In diesen Fällen kann die Untersuchung von Pefloxacin (ein weiteres Fluorochinolon) weitere Information dazu liefern, ob das Isolat bereits die ersten Schritte auf dem Weg zur vollständigen, durch mehrere Schritte bedingte Resistenz gegangen ist. Durch Kultivierung in Anreicherungsbouillons mit Colistin (2 mg/l) und Überprüfung auf Colistin-Selektivplatten wurden gegen dieses Reserveantibiotikum resistente Enterobakterien gesucht.

Für *S. aureus* wurde auf Resistenzen gegen

- Oxacillin¹ (ein Isoxazolympenicillin)
- Tetracyclin
- Fusidinsäure
- Erythromycin
- Clindamycin

untersucht. Resistenzen gegen Oxacillin definieren einen MRSA², Resistenzen gegen Fusidinsäure und Tetracyclin werden in veterinärmedizinischen Isolaten häufiger gefunden. Humanpathogene *Campylobacter* (*C. jejuni* und *C. coli*) wurde auf Resistenz gegen

- Ciprofloxacin
- Tetracyclin
- Erythromycin

1 In der Tat muss man zur Erkennung der Resistenz gegen Oxacillin Cefoxitin testen. Zum einfacheren Verständnis steht hier Oxacillin.

2 MRSA bedeutet Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*. Methicillin ist ein nicht mehr verwendetes Penicillin, der Nachfolger ist Oxacillin (und seine Derivate).

getestet.

Bei Enterokokken wurde Resistenz gegen

- Ampicillin (ein Aminopenicillin)
- Vancomycin (die Resistenz definiert den VRE¹)
- Linezolid (ein Oxazolidinon)

untersucht. Resistenzen insbesondere gegen Vancomycin und Linezolid wären bedenklich, weil diese Substanzen häufig die letzten noch anwendbaren Antibiotika bei *Enterococcus faecium* darstellen².

Ergebnisse

719 Isolate differenziert.

Nur eine Probe war komplett negativ, d.h., keinerlei Nachweis von Bakterien mit den verwendeten Verfahren (40-DE-Döbeln).

Durchschnittlich wurden bei LDC 4,3, bei PHW 5,5 und bei PLUKON 3,4 unterschiedliche Spezies pro Probe nachgewiesen.

Salmonellen durchgehend negativ.

Zusammengefasste Darstellung

Es wurden in bis zu 59% der Proben resistente Bakterien nachgewiesen.

In dieser Tabelle wurden Isolate als resistent gezählt, wenn sie folgende Eigenschaften aufwiesen:

- *E. coli* oder *P. mirabilis* (zwei Enterobakterien) mit Resistenz gegen Piperacillin
- Enterobakterien mit Hochresistenz oder Erstschrittresistenz gegen Fluorochinolone
- Enterobakterien mit Nachweis von ESBL
- *S. aureus* mit Resistenz gegen Oxacillin (MRSA)
- *Campylobacter* spp. mit Resistenz gegen Fluorochinolone

Nachweis von resistenten Isolaten in den Proben

Konzern	Anzahl Proben	Belastete Proben* (%)
LDC	56	32 (57)
PHW	54	32 (59)
PLUKON	55	20 (36)

* Die Unterschiede sind statistisch signifikant (p=0.03, Pearson's Chi-Squared)

1 VRE, Vancomycin resistenter Enterococcus; fast ausschließlich *Enterococcus faecium*.

2 Die zweite, humanmedizinisch wichtige Spezies ist *Enterococcus faecalis*. Bei dieser sind Resistenzen gegen die getesteten Antibiotika aber ausgesprochen selten.

Nachweis bakterieller Spezies in den Proben

Zunächst die Darstellung der insgesamt gefundenen Spezies, wobei Doppelnennungen (d.h., eine Probe enthält die Spezies mehrfach) nicht ausgeschlossen sind.

Nachgewiesene gramnegativen Spezies

Spezies	Anzahl
<i>E. coli</i>	116
<i>Hafnia alvei</i>	35
<i>Aeromonas veronii</i>	27
<i>Serratia liquefaciens</i>	24
<i>Aeromonas bestiarium</i>	21
<i>Proteus mirabilis</i>	18
<i>Aeromonas salmonicida</i>	16
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	16
<i>Buttiauxella spp</i>	13
<i>Serratia fonticola/liquefaciens</i>	13
<i>Aeromonas spp.</i>	11
<i>Providencia rustigianii</i>	11
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	10
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	9
<i>Morganella morganii</i>	9
<i>Pseudomonas gessardii</i>	9
<i>Pseudomonas libanensis</i>	9
<i>Pseudomonas koreensis</i>	8
<i>Carnobacterium divergens</i>	7
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	7
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6
<i>Citrobacter spp</i>	6
<i>Citrobacter freundii complex</i>	5
<i>Comamonas kerstersii</i>	5
<i>Ewingella americana</i>	5
<i>Myroides phacus</i>	5
<i>Pantoea agglomerans</i>	5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5
<i>Pseudomonas lundensis</i>	5
<i>Rahnella aquatilis</i>	5
Andere (61 Spezies)	107

Nachgewiesene grampositive Spezies

Spezies	Anzahl
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	22
<i>Streptococcus canis</i>	20
<i>Rothia endophytica</i>	18
<i>Lactobacillus spp.</i>	10
<i>Lactococcus garviae</i>	5
<i>S. sciuri</i>	5
Andere (41 Spezies)	69

Gramnegative Spezies nach Konzernen

Darstellung der nachgewiesenen gramnegativen Spezies aufgeschlüsselt nach Konzernen, hier wurden Doppelnennungen ausgeschlossen (also nur maximal ein Nachweis pro Probe gezählt). Dabei Konzentration auf die am häufigsten nachgewiesenen Spezies und solche mit besonderer humanpathogener Bedeutung (*Acinetobacter* spp.). Darstellung der intrinsisch gegen Cephalosporine (AmpC) und Carbapeneme resistenten Spezies als Gruppe. *A. salmonicida* wurde aufgenommen, weil diese Spezies relativ häufig nachgewiesen wurde,

Nachweis gramnegativer Spezies nach Konzernen

	N	<i>E. coli</i> *	<i>H. alvei</i> *	Enterobakterien*	Enterobakterien mit intrinsischer AmpC ⁺	Spezies mit intrinsischer Carbapenemresistenz
LDC	56	44	3	52	31	25
PHW	54	40	12	52	36	20
PLUKON	55	23	19	45	31	23

*Diese Unterschiede der Nachweishäufigkeiten der Spezies-(Gruppen) sind statistisch signifikant ($p < 0.01$).

*Dies sind u.A. *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*-complex, *Hafnia alvei*, *Serratia* spp.

	N	Spezies mit intrinsischer Carbapenemresistenz [#]	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>A. baumannii</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> **
LDC	56	25	6	3	11
PHW	54	20	7	3	3
PLUKON	55	23	3	0	1

*Diese Unterschiede der Nachweishäufigkeiten der Spezies-(Gruppen) sind statistisch signifikant ($p < 0.01$).

[#] Dies sind typischerweise Bakterien der allgemein als Nonfermenter bezeichneten Gruppe, die typisch in Wasser und Umwelt verbreitet sind. Von diesen besitzen einige immer eine Carbapenemresistenz

^{**}Fischpathogenes Bakterium, das, weil es bei 37°C schlecht wachsen kann, nicht oder nur sehr selten Infektionen beim Menschen verursacht.

Grampositive Spezies nach Konzernen

	N	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> *	<i>Staphylococcus aureus</i> *	<i>Streptococcus canis</i> **
LDC	56	15	1	10
PHW	54	4	17	9
PLUKON	55	3	4	1

*Diese Unterschiede der Nachweishäufigkeiten der Spezies-(Gruppen) sind statistisch signifikant ($p < 0.01$).

+Verursacht Infektionen bei Hunden, gelegentlich wohl auch beim Menschen

Es wurden in 10 Proben Yersinien nachgewiesen.

Yersinia enterocolitica (möglicher Erreger von Durchfall) wurde 3-mal nachgewiesen,

Yersinia intermedia (ebenfalls gelegentlich pathogen) ebenfalls 3 mal.

Ansonsten fanden sich nicht humanpathogene Yersinien.

Konzern	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. intermedia</i>	andere Yersinien
LDC	1	1	0
PHW	0	1	2
PLUKON	2	1	2

Da *Campylobacter jejuni* die derzeit häufigste Ursache von bakteriell bedingter Diarrhoe ist, wurde diese Spezies ebenfalls gesucht. In 10 Proben fand sich *Campylobacter*. Die Nachweishäufigkeit unterscheidet sich zwischen den Konzernen.

Nachweise von *Campylobacter coli* oder *C. jejuni*

Konzern	N	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter</i> (%)
LDC	56	2	6	8 (14)
PHW	54		2	2 (4)
PLUKON	55			0

Fisher's exact test p-value = 0.003525

Wichtige Resistenzen können bei Fluorochinolonen, Tetracyclin und Erythromycin vorliegen.

Resistenzen bei *Campylobacter*

Konzern	Ciprofloxacin	Tetracyclin	Erythromycin
LDC	5/8	5/8	-
PHW	1/2	1/2	-
PLUKON	-	-	-

MRSA-Nachweise in der Tiermast sind schon häufig thematisiert worden. *S. aureus* ist zudem humanpathogen und verursacht neben Hautinfektionen auch Pneumonien (Lungenentzündungen) und Septikämien (Blutvergiftung). Auch hier unterscheidet sich Häufigkeit des Nachweises von *S. aureus* sowie von MRSA nach Konzernen.

Nachweise von *Staphylococcus aureus* und MRSA

Konzern	N	<i>S. aureus</i> *	davon MRSA
LDC	56	1	
PHW	54	17	13 ⁺
PLUKON	55	4	

*Die Differenzen sind statistisch signifikant ($p=7.6e-5$, Fisher's exact test)

⁺Die MRSA-Nachweise beschränken sich auf einen Schlachthof (DE NI 11101 EG)

Ein wichtiges Augenmerk der Studie lag auf dem Nachweis von Resistenzen bei Enterobakterien und dort insbesondere von ESBL (Extended-Spektrum- β -Laktamasen). ESBL wurden bei 9 Isolaten gefunden, davon waren 6 *S. fonticola*, eine Spezies, die verschiedentlich auf Lebensmitteln unterschiedlicher Art und Herkunft gefunden wurde.

Enterobakterien und ESBL

Konzern	N	Enterobakterien mit ESBL	
LDC	56	3	<i>S. fonticola</i>
PHW	54	2	<i>S. fonticola</i> <i>E. coli</i>
PLUKON	55	4	<i>S. fonticola</i> (2) <i>R. aquatilis</i> <i>E. coli</i>

Die beiden nachgewiesenen *E. coli*-Stämme waren **3MRGN** (d.h. wiesen gleichzeitig eine Resistenz gegen Fluorochinolone auf).

Resistenz gegen Fluorochinolone sind Teil der MRGN-Klassifikation und die Substanzen sind wichtige Therapeutika. Die Resistenz wird durch unterschiedliche Mechanismen verursacht, von denen einige eine niedriggradige Verminderung der Empfindlichkeit bewirken, andere, insbesondere in Kombination mit den vorgenannten, eine Hochresistenz. Zunächst die Darstellung der gegen Ciprofloxacin vollständig resistenten Isolate.

Enterobakterien mit Ciprofloxacin-Resistenz

Konzern	N	Enterobakterien mit Ciprofloxacinresistenz*
LDC	56	19
PHW	54	7
PLUKON	55	5

* nur vollständige Resistenz gewertet (HHD < 22mm)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 12.53, df = 2, p-value = 0.001502

Die Spezies waren *E. coli* und *Proteus mirabilis*, ein Isolat war *Enterobacter cloacae*-complex.

Enterobakterien mit Resistenz gegen Fluorochinolone unter Berücksichtigung der niedriggradigen Resistenz

Konzern	N	Enterobakterien mit Ciprofloxacinresistenz*
LDC	56	22
PHW	54	17
PLUKON	55	11

* nach Retest der Stämme mit verminderter Empfindlichkeit (22 < Cipro-HHD ≤ 24 und Pefloxacin < 24)

Die Differenzen zwischen den Konzernen sind nicht mehr signifikant (p=0.085).

Bei LDC kam also häufig (19/56, 33%) vollständige Resistenz gegen Fluorochinolone vor, bei PHW und PLUKON hingegen zu etwa 50% auch niedriggradige Resistenz. Insgesamt bedeutet das Ergebnis, dass **in 30% aller Proben Chinolonresistenz verschiedener Ausprägung** gefunden wurde.

Zusammenfassung

Insgesamt waren über 50% aller Proben mit resistenten Bakterien belastet. Dabei waren zwei Konzerne (PHW und LDC) mit jeweils 59% und 57% häufiger betroffen als der dritte (PLUKON) mit 36%.

Resistenz gegen Fluorochinolone in verschiedener Ausprägung wurde bei insgesamt 30 % aller Proben nachgewiesen. Vollständige Chinolonresistenz wurde bei 19 % gefunden, wobei ein Konzern (LDC) stärker als die anderen betroffen war.

ESBL wurde insgesamt bei 9 Proben gefunden (5,4 %) ohne Präferenz für einen Konzern. Bei zwei *E. coli*-Isolaten wurde eine Multiresistenz (3MRGN) gefunden.

Campylobacter spp. mit humanpathogener Relevanz wurden in 10 Proben (6 %) nachgewiesen, von diesen waren 6 gegen Chinolone und 6 gegen Tetracycline resistent. Mit *Campylobacter* waren die Proben von LDC und PHW belastet.

Yersinien fanden sich in 6 Proben.

Staphylococcus aureus wurde 22 Mal nachgewiesen, davon waren 13 MRSA, welche ausschließlich bei Proben eines Konzernes (und eines Schlachthofes, DE NI 11101 EG) gefunden wurden.

Es fällt auf, dass die Nachweise einiger Bakterienspezies bei den Konzernen sehr unterschiedlich häufig sind. Für den Nachweis von Enterobakterien mit intrinsischer AmpC- β -Laktamase oder von Bakterien mit intrinsischer Carbapenemase gibt es hingegen keine Unterschiede zwischen den Konzernen.

Methoden

1. Direkter Ansatz

Abstrich von möglichst großer Fläche unter Berücksichtigung auch versteckter Areale, einschließlich evtl. vorhandener Haut.
Suspendieren in physiologischer NaCl-Lösung.

2. Ausstrich der Suspension auf

1. Blutagar (10 μ l)
2. McConkey-Agar (10 μ l)
3. ESBL-Agar
4. MRSA-Agar
5. VRE-Agar
6. Chapman-Agar
7. Colistin-Selektivagar
8. *Campylobacter*-Selektiv-Agar

9. XLD (Salmonella) Agar
 10. Einbringen in Anreicherungsbrühe (die nur untersucht wird, wenn auf Blut- und McConkey-Agar sehr wenig oder kein Wachstum ist)
 11. Einbringen in eine Anreicherungsbrühe mit Colistin
-
- 3. Ausstreichen der Anreicherungsbrühe**, wenn wenig oder kein Wachstum auf Originalplatten, jeweils auf die gleichen Medien (nicht Campylobacter) wie direkt.
-
- 4. Isolierung von Kolonien unterschiedlicher Morphologie und Speziesbestimmung per MALDI-TOF**
 1. Resistenzbestimmung nach EUCAST (V 10.0) von *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Enterobacterales, pathogenen Pseudomonaden, Campylobacter
 1. Staphylococcus: Cefoxitin, Fusidinsäure, Tetracyclin, Erythromycin, Clindamycin, Linezolid
 2. Enterococcus: Vancomycin, Ampicillin, Linezolid
 3. Campylobacter: Ciprofloxacin, Erythromycin, Tetracyclin
 4. Enterobacterales: Piperacillin, Cefotaxim, Ceftazidim, Ertapenem, Imipenem, Ciprofloxacin
 1. Wenn Cefotaxim oder Ceftazidim R: MAST-Test auf ESBL
 2. Wenn Ertapenem R oder Imipenem nicht S, Carbapenemasenachweise
 3. Wenn Ciprofloxacin in ATU, Pefloxacin.
-
- 5. Statistische Berechnungen mit R (3.6.3)**

Prof. Dr. med. Sören Gatermann
Facharzt für Mikrobiologie, Virologie
und Infektionsepidemiologie
ECCMID Fellow