

Enterobacteriaceae in Geflügel während des Schlachtprozesses

Philine von Tippelskirch¹, Greta Götz¹, Stefanie Orquera¹, Michaela Projahn², Katrin Dähre², Anika Friese², Uwe Rösler², Thomas Alter¹
¹Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Freie Universität Berlin, ²Institut für Tier- und Umwelthygiene, Freie Universität Berlin

Einleitung

Extended Spectrum β -Lactamasen (ESBL) und AmpC β -Lactamasen (AmpC) stellen sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin ein zunehmendes Problem dar. Da sich die resistenten Bakterien auch auf Lebensmitteln tierischen Ursprungs befinden, könnten diese bei der Übertragung resistenter Bakterien eine Rolle spielen. In anderen Studien konnten bereits hohe Prävalenzen ESBL/AmpC-produzierender *Escherichia coli* in Geflügel gezeigt werden, allerdings gibt es bisher nur wenige Daten zur quantitativen Belastung. Im Rahmen dieser Studie wurden daher bei vier Masthähnchenherden jeweils 25 Caeca, 25 Karkassen und 25 Filets der jeweiligen Schlachtcharge sowie die Umgebung (n = 13) des Schlachthofs qualitativ sowie je 10 Caecum-, 10 Haut- und 5 Filetproben quantitativ auf ESBL-/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* untersucht.

Material und Methoden

Isolierung der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae*

Jeweils 5 g Caecuminhalt aus den Darmkonvoluten, 25 g Brusthaut von den Karkassen, 25 g Filet, 10 ml Brühwasser, 3 ml PBS des Luftkeimsammlers und die Umgebungstupfer wurden 1:10 mit LB-Bouillon verdünnt und durchmischt. Hieraus wurden serielle 1:10 Verdünnungen zur Quantifizierung der *Enterobacteriaceae* bzw. Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* angefertigt und auf MacConkey-Agar-Platten ohne Antibiotikum (MC-) bzw. mit Cefotaxim (1 μ g/ml) (MC+) aufgebracht. Die Platten sowie der Rest des 1:10 verdünnten Probenmaterials wurden bei 37 °C aerob für 24 h inkubiert.

Für den qualitativen Nachweis wurde mit je 10 μ l des angereicherten Probenmaterials ein fraktionierter Verdünnungsausstrich auf MC+ Platten angefertigt und diese bei 37 °C aerob für 24 h inkubiert.

Genus- und Spezies-Bestimmung der Isolate

Die Kolonien wurden nach ihrer Morphologie ausgezählt bzw. isoliert und anschließend das Genus und die Spezies der Isolate mittels MALDI-TOF MS nach Murugaiyan et al. (2014) bestimmt.

Bestimmung des Antibiotikaresistenz-Profiles der Isolate

Das Antibiotikaresistenz-Profil wurde mittels Plättchen-Diffusionstest entsprechend des empfohlenen CLSI Standards (M100 – S24, 2014) bestimmt. Die Übernachtskulturen der Isolate wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,09 (\pm 0,5 McFarland) verdünnt. Je 100 μ l der verdünnten Kulturen wurden auf Müller-Hinton-Agar ausplattiert, anschließend die Antibiotika-Plättchen (Cefotaxim 30 μ g, Cefotaxim 30 μ g/Clavulansäure 10 μ g, Cefotaxim 30 μ g, Cefotaxim 30 μ g) mit Hilfe eines Dispensers aufgebracht. Nach der Inkubation der Platten (37 °C, aerob, 18 h) wurden die Hemmhofgrößen gemessen.

Bestimmung der ESBL/AmpC-Gene

Die DNA der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* wurde mithilfe der Chelex-Methode isoliert und mittels realtime PCR nach Roschanski et al. (2014) auf das Vorhandensein der Gene *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} sowie *bla*_{CMY} untersucht.

Ergebnisse

Qualitative Analyse

Durchschnittlich wiesen in den vier Herden 40 % (40/100) der Caecum-, 75 % (75/100) der Haut-, 21 % (21/100) der Filet- und 35 % (18/52) der Umgebungsproben ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* auf. Die Prävalenzen in den Herden fielen sehr unterschiedlich aus (Abb. 1).

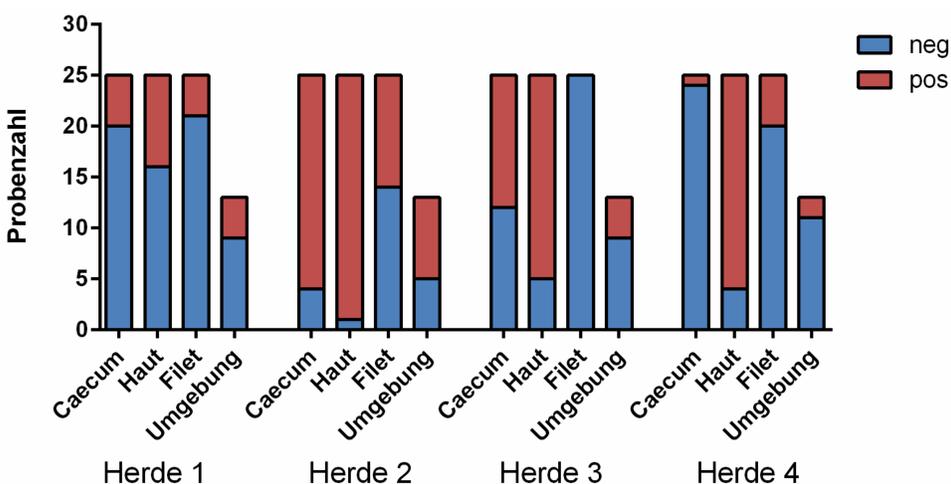


Abb. 1: Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* in den vier untersuchten Herden

Quantitative Analyse

Bei 57 % (23/40) der Caecum-, 47 % (19/40) der Haut- und 85 % (17/20) der Filetproben lagen die Keimzahlen der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* unter der quantitativen Nachweisgrenze von 1,5 x 10² KbE/g (Caecum, Haut) bzw. 1,5 x 10¹ KbE/g (Filet).

Wurden Cefotaxim-resistente *Enterobacteriaceae* nachgewiesen, lag die Keimzahl im Median in den Caecum- und Hautproben mit 2,5 x 10³ KbE/g bzw. 1,5 x 10³ KbE/g höher als in den Filetproben (7 x 10¹ KbE/g) (Abb. 2).

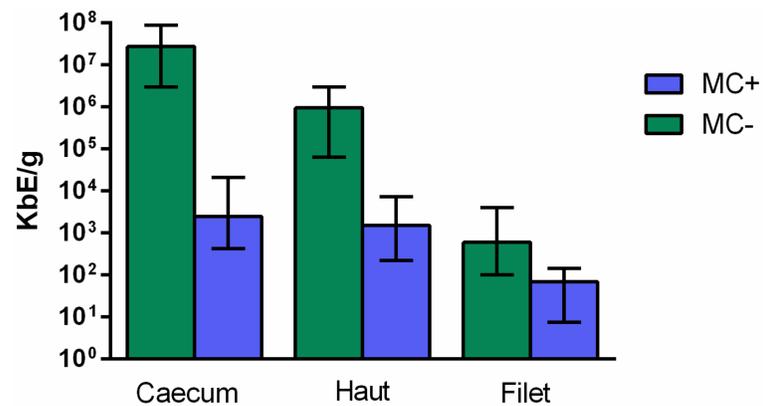


Abb. 2: Keimzahl der *Enterobacteriaceae* (MC-) sowie der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* (MC+) über der Nachweisgrenze von 1,5 x 10² KbE/g (Caecum, Haut) bzw. 1,5 x 10¹ KbE/g (Filet) in den Caecum-, Haut- und Filetproben der vier untersuchten Herden. Dargestellt ist der Median + IQR.

Genus- und Spezies-Bestimmung

Mittels MALDI-TOF MS konnten von insgesamt 547 isolierten Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* 91 % als *Escherichia coli* identifiziert werden. Bei den restlichen Isolaten handelte es sich um *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii* sowie *Enterobacter* spp.

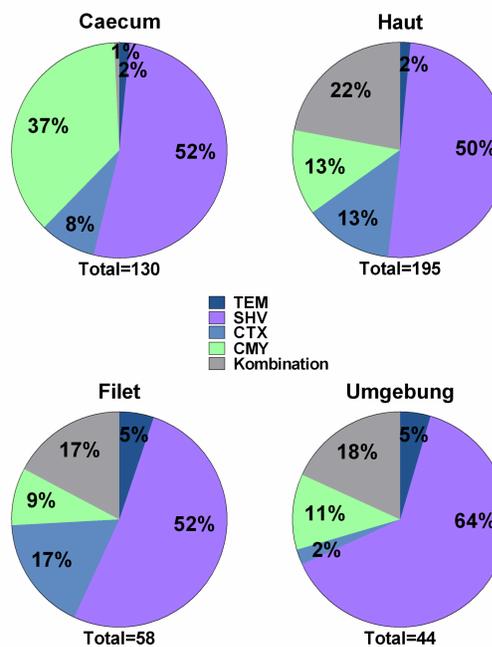


Abb. 3: Nachweis der ESBL/AmpC-Gene aus den Isolaten der Herde 1-4.

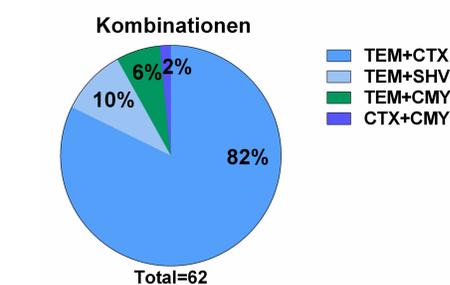


Abb. 4: Nachweis der ESBL/AmpC-Gene aus den Isolaten mit mehr als einem ESBL/AmpC-Gen

Zusammenfassung

Innerhalb der verschiedenen Probenmatrices sowie in den vier Herden zeigten sich unterschiedlich hohe Prävalenzen ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae*.

Trotz hoher Prävalenzen von bis zu 75 % lag bei 47–85 % der Proben die Keimzahl unter der Nachweisgrenze von 1,5 x 10² KbE/g (Caecum, Haut) bzw. 1,5 x 10¹ KbE/g (Filet). Die Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* lag in allen untersuchten Proben im Median 1-4 Logstufen unter der Keimzahl der *Enterobacteriaceae*.

In allen Probenmatrices konnte *bla*_{SHV} am häufigsten nachgewiesen werden.

Die Studie wurde im Rahmen des RESET-Projektes durchgeführt, welches mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert wird.

