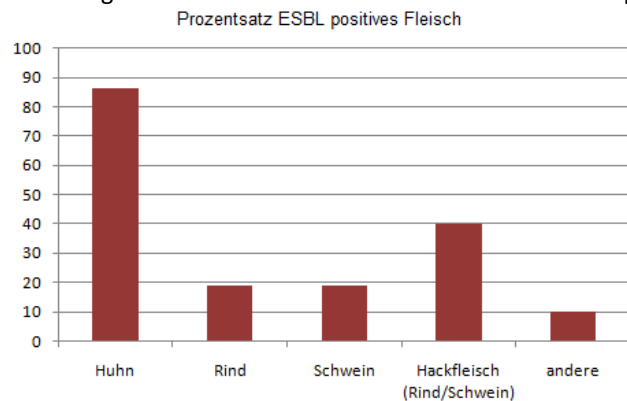


Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains.
Leverstein Van-Hall et al. Clin Microb Infect 2011 Jun 17(6) 873-80

Hintergrund

- Alarmierende weltweite Zunahme von durch ESBL-gram neg. Keime verursachte Infektionen in den letzten Jahren, auch in Ländern mit tiefer Resistenzrate e.g. Niederlande
 - In Niederlanden tiefer Antibiotikaverbrauch, bisher erfolgreich in der Kontrolle von nosokomialer Verbreitung multiresistenter Bakterien
 - im ggs zu Antibiotikaverbrauch bei Menschen im Vgl zu anderen europäischen Ländern in den Niederlanden sehr hoher AB-Verbrauch in Geflügelindustrie [Anstieg ESBL E.coli im Darm von Geflügel: 3% (2003)→ 15%(2008)]
- Geflügelindustrie als Reservoir von ESBL Keimen ? Akquirierung bei Menschen durch Abfertigung/Konsum?



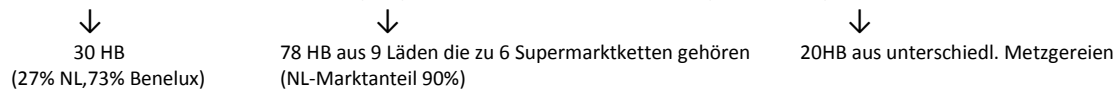
Overdevest et al(NL) Poster Eccmid Vienna 2010: 50% aller Fleischprodukte enthielten ESBL, Hühnerfleisch war mit 85% am häufigsten vertreten

Quelle: Infektio St.Gallen

Methoden

Einzelhandelgeflügelfleisch-Sammlung:

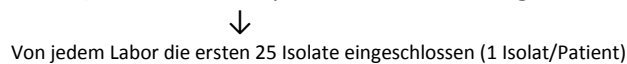
98 rohe Hühnerbrüste(HB) aus 12 Läden in Utrecht (04-06/10)



Geflügel: Isolate aus Niederländischem Surveillance Programm der Antibiotikaresistenzen in „Nahrungsmittel-“ Tieren 2006. Strategie des Programmes: jährliche Sammlung von E.coli und Salmonella enterica. 12% aller Isolate waren Cefotaxime-R. 5 ESBL gene gefunden in n=35. Prädominanz bla_{CTX-M-1} und bla_{TEM-25} → eingeschlossen(n=27)

Humanisolate:

31 NL-Laboratorien (02-03/09): alle E.coli mit pos ESBL screen° eingeschlossen



° = MIC>1mg/l für cefotaxime o ceftazidim oder ESBL Alarm durch phoenix oder vitek

68% Urin samples, 8% Wunden, 3% Blut

Molekulare Analyse:

- Präsenz von ESBL-genen nachgewiesen mittels Micoarray-analyse (s.Appendix) und Gensequenzierung
- Plasmid Analyse bei zufälliger Selektion von humanen- und Geflügelisolaten die entweder bla_{CTX-M-1} oder bla_{TEM-25} gen trugen. Plasmide charakterisiert durch PCR-based replicon typing Assoziation zwischen ESBL gene und Plasmid durch Southern blot hybridization oder transformation determiniert. Genotypisierung durch multi-locus sequence typing (MLST)

Resultate

Poultry-associated ESBL genes	Poultry	Poultry meat samples ^a	Human ^a
	n = 35	n = 81	n = 409
<i>bla</i> _{CTX-M-1} (%)	49	49	24
<i>bla</i> _{TEM-52} (%)	29	26	6
<i>bla</i> _{SHV-12} (%)	0	16	4
<i>bla</i> _{SHV-2} (%)	11	4	0.4
<i>bla</i> _{CTX-M-2} (%)	9	4	0.2
<i>bla</i> _{TEM-20} (%)	3	1	0
Total (%)	100	100	35

The number of isolates analysed by array among meat and human isolates was 81 and 409, respectively. The number of isolates analysed by sequencing among poultry, meat and human isolates was 35 (100%), 81 (100%) and 208 (51%), respectively.

^aPercentages are extrapolations based on array results and sequence results. For calculation of the percentages see also Fig. 1. For example percentage of *bla*_{CTX-M-1} in human isolates = $0.84 \times 0.85 \times 0.34 = 24\%$.

Geflügelfleisch:

- 98 samples → ESBL-produzierende E.coli isoliert aus 92 (94%) (Total 163 Isolate)
- aus 42 samples (81 Isolate) → Nachweis von Genen aus 6 ESBL-Gruppen (CTX.M-1 Gruppe prädominant)
- *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{TEM-25} machten 78% dieser Gene aus

Hühner (Prevalence survey of poultry in NL in 2006):

- ähnliche Verteilung wie oben aber niedrigere Frequenz von ESBL prod. Bakt.
- 10% trugen ESBL gene, *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{TEM-25} zählten zusammen 78% dieser Gene

Level of genetic typing	% of human isolates with poultry associated genetic element ^a
ESBL genes (<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM-52} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{SHV-2} and <i>bla</i> _{CTX-M-2})	35% (see Table 1)
<i>bla</i> _{CTX-M-1} and <i>bla</i> _{TEM-52} genes	30% (23.7% <i>bla</i> _{CTX-M-1} ; 6.2% <i>bla</i> _{TEM-52})
<i>bla</i> _{CTX-M-1} and <i>bla</i> _{TEM-52} genes on IncI plasmid	20% (14.2% <i>bla</i> _{CTX-M-1} ; 6.2% <i>bla</i> _{TEM-52})
<i>bla</i> _{CTX-M-1} and <i>bla</i> _{TEM-52} genes on IncI plasmid belonging to complex CC7 or CC3 and CC5 resp.	19% (12.6% <i>bla</i> _{CTX-M-1} ; 6.2% <i>bla</i> _{TEM-52})
<i>bla</i> _{CTX-M-1} and <i>bla</i> _{TEM-52} genes on IncI plasmid belonging to complex CC7 or CC3 and CC5 resp. in a poultry-associated MLST strain (ST10, ST58 or ST117)	11% (9.5% <i>bla</i> _{CTX-M-1} ; 2.0% <i>bla</i> _{TEM-52})

MLST, multi-locus sequence typing.
For example percentage of *bla*_{TEM-52} genes on IncI plasmid belonging to complex CC5 in to poultry identical MLST strains = 0.84 (row A) × 0.09 (row B) × 0.82 (row C) × 1 (row D) × 1 (row E) × 0.33 (row F) = 2.0%.

^aPercentages are extrapolations based on array results, sequence results and results of plasmid characterization and strain typing. For calculation of the percentages see Fig. 1.

Humanisolate:

Whd Studienperiode waren 1017 E.coli ESBL-positiv gescreent. Davon 516 eingeschlossen, 409 Isolate (79%) hatten ESBL gene (Isolate: 54% Spital nicht universitär, 30% general practitioner, 6% unispital, 5% Langzeitpflege, 5% unbekannt)

- 409 Isolate → 35% hatten Geflügel assoziierte ESBL gene, 19% davon auf Plasmiden die genetisch gleich waren wie die, welche im Geflügel gefunden wurden
- auch hier, *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{TEM-25} am meisten prävalent (Zusammen 86%)
- Proportion der *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{TEM-25} Gene war gleich zwischen den Altersgruppen und zwischen Isolaten aus Ambulatorien/Praxen, Spital, Pflegeheimen

Diskussion

Diese Resultate lassen Übertragung von ESBL-produzierenden e.coli von Geflügel auf den Menschen vermuten. Unterstreicht diese These: Prävalenz von CTX-M-1 und TEM-52 Genen in E.coli aus humanen Isolaten höher in den Niederlanden als in anderen Ländern. Zunahme dieser Gene bei E.coli aus humanen Isolaten korreliert mit Zunahme ebendieser ESBL-Gene bei Hühnern.

Extrem hohe Prävalenz der ESBL in Geflügelfleisch alarmierend, whs nicht nur auf NL beschränkt: Ziel Perfekte Hygiene beim „handling“ des Fleisches, Verminderung Antibiotikagebrauch in Tierzuchten.

Limitation:

1. Vergleich des Spektrums von ESBL genen aus verschiedenen Jahren. 2006 (Hühnerzucht) 2010(geflügelfleisch), 2009(humane Isolate)
2. Plasmid Analyse limitiert auf kleine Selektion von Isolaten mit CTX-M-1 und TEM-52 genen

DIAGNOSTISCHE METHODEN

Phänotypisch

Automatisiert mittels VITEK oder Phoenix

Klassisch:

1. Schritt: Screening nach reduzierter Empfindlichkeit gegenüber mehr als nur einem der Indikator Cephalosporine
2. Schritt: Bestätigung ESBL-Produktion: Nachweis des Synergieeffektes zwischen dem getesteten Antibiotikum und β -Lactamaseinhibitoren.
→ wenn der Keim gegenüber der Antibiotikum/Inhibitor-Kombination signifikant empfindlicher ist als gegenüber der Substanz alleine gilt dies als ESBL-Bestätigung.

Probleme der Phänotypischen Bestimmung: Ein negativer Bestätigungstest nach positivem screening. Hat mehrere Gründe z.B. bei Vorhandensein von durch Clavulansäure schlecht hemmbare Klasse B oder D β -Lactamasen, oder plasmidkodierte AmpC- β -Lactamasen etc. diese maskieren die Empfindlichkeit der ESBL gegenüber Clavulansäure

Genotypisch

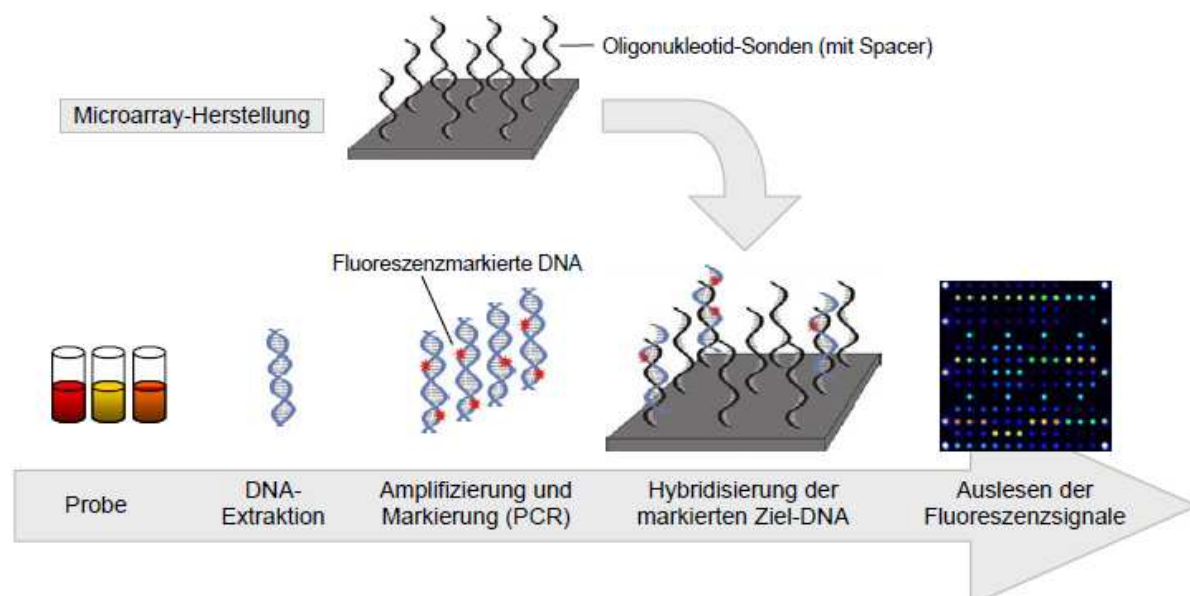
bla = β -Lactamasegen

β -Lactamase-Enzyme: TEM, SHV, CTX-M (ca 160 TEM und über 110 SHV-Varianten beschrieben)

SHV: Sulfhydryl reagent variable TEM: Temoneira CTX-M: Active on cefotaxime, first isolated at Munich

DNA microarray: gleichzeitige Genotypisierung der 3 häufigsten β -Lactamase-Genfamilien *bla*_{TEM} *bla*_{SHV} *bla*_{CTX-M}

(also commonly known as gene chip, DNA chip, or biochip) is a collection of microscopic DNA spots attached to a solid surface. Scientists use DNA microarrays to measure the expression levels of large numbers of genes simultaneously or to genotype multiple regions of a genome. Each DNA spot contains picomoles (10^{-12} moles) of a specific DNA sequence, known as *probes* (or *reporters*). These can be a short section of a gene or other DNA element that are used to hybridize a cDNA or cRNA sample (called *target*) under high-stringency conditions



EPIDEMIOLOGIE

Bis Ende der 90er Jahre in Europa dass 1. fast alle nachgewiesenen ESBL β -Lactamasen Typ TEM- oder SHV, 2. waren Isolate, die diese Enzyme produzierten meist mit nosokomialen Ausbrüchen auf Intensivstationen und nur selten mit ambulant erworbenen Infektionen assoziiert.

21. Jhd dramatisch verändert: CTX-M Enzyme haben TEM- und SHV- β -Lactamasen in vielen europäischen als vorherrschende ESBL-Spezies abgelöst. neuerdings aus dem ambulanten Bereich und anderen Krankenhausbereichen als Intensivmedizin.

Die Familie der **CTX-M- β -Lactamasen** sind am weitesten verbreitet und klinische Relevanz dieser Enzyme ist in Europa inzwischen höher zu einschätzen als die der TEM- und SHV-ESBLs (Rossolini et al 2008)

Es sind über 40 *bla*_{CTX-M}-Allele bekannt, die phylogenetisch meist in 5 Gruppen eingeteilt werden: CTX-M1-, CTX-M2-, M8-, M9-, und M25-Gruppe