

ABSCHLUSS-SYMPOSIUM des Verbundforschungsvorhabens EsRAM*

*Entwicklung stufenübergreifender Reduktionsmaßnahmen für Antibiotikaresistente Erreger beim Mastgeflügel



Abstract-Band

Koordiniert von



ZDG

Zentralverband der Deutschen
Geflügelwirtschaft e.V.

Freie Universität



Berlin

Gefördert durch



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

ptble

Projektträger Bundesanstalt
für Landwirtschaft und Ernährung

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

ENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG VON VERFAHREN ZUR BRUTEIDESINFEKTION UND BRUTEIHYGIENE GEGEN ESBL-BILDENDE E. COLI

Gerzon Motola¹, Wiebke Tebrün², Sarah Brüggemann-Schwarze¹, Josef Bachmeier³,
Michael Pees², Hafez M. Hafez¹

¹ Institut für Geflügelkrankheiten, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland

² Klinik für Vogel und Reptilien, Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

³Brüterei Süd, Regenstein, Deutschland

Hintergrund

Es ist bekannt, dass ESBL bildende Bakterien sowohl vertikal, als auch horizontal in Mastherden eingetragen werden können¹. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass Hygienemaßnahmen bereits am Brutei die Kükengesundheit verbessern, Mortalität reduzieren und das Produktionspotential positiv beeinflussen.

In diesem Teilprojekt wurde untersucht, ob etablierte und neue Bruteidesinfektionsmethoden wirksam für ESBL bildende E. coli sind, um sowohl den Eintrag nach vertikaler Infektion in die Produktionskette von Geflügelfleisch zu reduzieren bzw. zu eliminieren als auch deren Einfluss auf Schlupfrate und Kükengesundheit zu kontrollieren.

Versuchsaufbau

Um die Effektivität der Desinfektionsverfahren *in vitro* zu testen wurden Eischalen aus Bruteiern (Ross 308) als Keimträger künstlich mit einem CTX-M1 bildenden E. coli kontaminiert und anschließend in getrennten Gruppen mit sechs Desinfektionsmethoden behandelt: 1) Formaldehyd (als Referenzmethode)², 2) Wasserstoffperoxid-Alkohol-Gemisch, 3) Peressigsäure, 4 a) ätherische Öle als Spray, 4b) ätherische Öle als Kaltnebel und 5) niedrigenergetischen Elektronen Strahlung. Verbliebene Bakterien wurden nach der Behandlung reisoliert und die Desinfektionseffizienz ermittelt.

Die Versuche zur Ermittlung des Einflusses von Desinfektionsmitteln auf Bruteier und Küken wurden zunächst im Tierversuch getestet. Jedes Desinfektionsmittel wurde an einer Gruppe experimentell kontaminierter Eier (n=50) getestet und mit einer kontaminierten, nicht desinfizierten Kontrollgruppe (n=50) und einer nicht kontaminierten, nicht desinfizierten Kontrollgruppe (n=50) verglichen.

Von eingangs sechs verschiedenen Protokollen wurden anschließend geeignete Methoden für zwei Feldversuche ausgewählt und in Gruppengrößen von 1.400 - 27.000 respektive 1.400 Eiern pro Gruppe getestet.

Untersuchte Parameter für Tier- und Feldversuche waren im Bereich der Brut Befruchtungs- und Absterbe- sowie Schlupfraten, in der Aufzucht wurde die Mortalitätsrate

und Mastleistung erfasst und die Daten von Sektion (Tierversuch) und Schlachtung im Hinblick auf die Tiergesundheit ausgewertet.

Auswertung

Im Keimträgerversuch wurde eine Reduktion der reisolierten Bakterien um mindestens 2 Log-Stufen als wirksam beurteilt. Fünf der sechs getesteten Verfahren erfüllten dieses Kriterium (ätherische Öle als Kaltnebel wiesen eine ungenügende Wirksamkeit auf).

Im Tierversuch erwies sich die Anwendung von Formaldehyd, niedrig-energetischer Elektronenstrahlung und Peressigsäure als unauffällig in Bezug auf Brut, Schlupf, Mast und Tiergesundheit. Die mit Wasserstoffperoxid behandelte Versuchsgruppe zeigte Abweichungen der Schlupfrate, Mortalität und Körpermasseentwicklung im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Bei Anwendung ätherischer Öle als Spray war einzig die Schlupfrate deutlich erniedrigt. Als Vernebelung gab es keine Auffälligkeiten, jedoch zeigte dieses Protokoll eine nicht ausreichend desinfizierende Wirkung. Eine weitere Testung der ätherischen Öle wurde nicht vorgenommen.

Im Feldversuch wurde Wasserstoffperoxid im Vergleich mit Formaldehyd und einer nicht desinfizierten Gruppe an vier Durchgängen à 27.000 Bruteiern pro Gruppe getestet. Die Anwendung von Peressigsäure wurde auf Grund der Schaumformulierung kritisch betrachtet und nur an einem Durchgang getestet. Die Ergebnisse waren nur eingeschränkt belastbar, da eine antibiotische Behandlung erfolgte, sie flossen nicht in die finale Auswertung ein.

Die niedrig-energetische Elektronenstrahlung wurde an 1.400 Eiern in einem Durchgang gegen Formaldehyd getestet und bestätigte in diesem Maßstab die Ergebnisse aus dem Tierversuch. Alle erfassten Parameter in der Versuchsgruppe unterschieden sich kaum von der Formaldehyd-Vergleichsgruppe.

Ausblick

Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass alternative Methoden eine vergleichbare Effizienz in der Reduzierung bzw. Eliminierung von ESBL bildenden E. coli auf Eischalen Oberflächen von Bruteiern haben.

Anhand der Ergebnisse der Tierversuche und erster Ergebnisse aus den Feldversuchen ließen sich mehrere vielversprechende, rückstandsfreie Alternativen zur Formaldehydbegasung hervorheben. Zur Etablierung unter Praxisbedingungen ist es nötig, belastbares Datenmaterial zu sammeln und die bisherigen Ergebnisse zu validieren.

Literaturverzeichnis

1. Projahn, M et al (2017):
Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and Plasmid-Encoded Cephamycinase-Producing

Enterobacteria in the Broiler Hatchery as a Potential Mode of Pseudo-Vertical Transmission

2. Cadirci, S. (2009):
Disinfection of Hatching Eggs by Formaldehyd Fumigation – A Review. Archiv für Geflügelkunde; 73:116-123.

Korrespondenzadresse

Hafez M. Hafez
Sarah Brüggemann-Schwarze
Institut für Geflügelkrankheiten
Haus 31
Königsweg 63
14163 Berlin
Hafez.Mohamed@fu-berlin.de
sarah.brueggemann@fu-berlin.de

Michael Pees
Klinik für Vögel und Reptilien
An den Tierkliniken 17
04103 Leipzig
pees@vogelklinik.uni-leipzig.de

REDUZIERUNG ESBL-/AMPC-BILDENDER *ESCHERICHIA COLI* IN GEFLÜGEL-MIST DURCH AEROBE UND ANAEROBE BEHANDLUNGSVERFAHREN

Corinna Thomas¹, Christine Idler¹, Thomas Amon^{1, 2}

¹ Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e. V., Abteilung Technik in der Tierhaltung, Potsdam, Deutschland

² Institut Tier- und Umwelthygiene, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, Deutschland

Einleitung

Extended-Spektrum-Beta-Laktamase (ESBL)-bildende und AmpC-Beta-Laktamase-(AmpC)-bildende *Escherichia (E.) coli* sind in europäischen Masthähnchenbetrieben weit verbreitet [1,2]. Geflügelmist wird am Ende eines Mastdurchgangs in der Regel entweder zunächst zwischengelagert oder direkt als wertvoller Wirtschaftsdünger auf Feldern ausgebracht. Dies führt zu der Frage, ob dadurch antibiotikaresistente Erreger in die Nahrungskette des Menschen gelangen können. Es gibt verschiedene Behandlungsverfahren für anfallenden Mist aus der Nutztierhaltung, von denen bekannt ist, dass verschiedene Erreger dabei reduziert werden können, wie zum Beispiel die Kompostierung und die anaerobe Vergärung in Biogasanlagen [3]. Das Ziel dieses Arbeitspaketes war es, verschiedene Behandlungsverfahren von Geflügelmist hinsichtlich ihrer reduzierenden Wirkung auf ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* zu untersuchen und Empfehlungen für die Praxis zu erarbeiten.

Material und Methoden

Im Labormaßstab wurden anaerobe und aerobe Tests in Bioreaktoren durchgeführt. Hierzu wurde Geflügelmist mit ESBL/AmpC-bildenden *E. coli*-Stämmen zu Anfangskonzentrationen von 10^7 Kolonien bildende Einheiten (KbE)/ml bzw. KbE/g angereichert.

Bei den anaeroben Gärtests wurden die Versuche bei mesophilen (37°C, 42°C) und thermophilen (55°C) Temperaturen durchgeführt, die Kompostversuche dagegen bei konstant 40°C. Bei diesen Versuchen wurden Trockensubstanzgehalte (40%; 60%; 80%) und Kohlenstoff/Stickstoff (C/N)-Verhältnisse (10:1; 20:1; 40:1) variiert.

Kompostversuche wurden auch im Pilotmaßstab durchgeführt, bei denen in Sommer- und Winterversuchen die Reduzierung eines nicht-pathogenen *E. coli*- Stammes in je drei unterschiedlichen Mieten (L=5,5m; B=3m; H=1,5m) untersucht wurde.

Bei allen Versuchen wurden die regelmäßig gewonnenen Proben quantitativ und qualitativ auf (ESBL-bildende) *E. coli* untersucht. Ergänzend sind chemische Parameter der Substrate wie pH-Wert, Ammoniumstickstoff und flüchtige Fettsäuren analysiert worden.

Ergebnisse

Bei den anaeroben Gärtests waren beide ESBL- bzw. AmpC-bildende *E. coli*-Stämme sowohl bei mesophilen als auch bei thermophilen Temperaturen innerhalb von 35 Tagen nicht mehr nachweisbar. Die Temperatur hatte einen signifikanten Einfluss auf die Reduzierungskinetik der beiden Stämme. Bei 55°C war die Nachweisgrenze der *E. coli* bereits nach zwei Stunden erreicht.

Bei der Kompostierung in Bioreaktoren hatten sowohl das C/N -Verhältnis als auch der Trockensubstanzgehalt einen signifikanten Einfluss auf die Reduzierung der ESBL-bildenden *E. coli*. Kompostmischungen mit einem engen C/N-Verhältnis von 10:1 reduzierten den Stamm signifikant schneller als andere Kompostmischungen. Ebenso reduzierten im Durchschnitt trockenere Kompostmischungen besser als feuchte. Die Tage bis zum Erreichen der Nachweisgrenze variierten von nur einem Tag bis maximal 24 Tage.

Bei den durchgeführten Kompostversuchen im Pilotmaßstab war *E. coli* DSM 1116 bereits nach 24 Stunden im Direktausstrich sowohl in den Sommer- als auch in den Winterversuchen nicht mehr nachweisbar. Vor allem hohe Temperaturen innerhalb der Mieten sind hierfür ursächlich.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Ergebnisse des Arbeitspaketes zeigen, dass die getesteten Behandlungsverfahren für Geflügelmist die Belastung mit ESBL-bildenden *E. coli* signifikant reduzieren und damit das Emissionsrisiko senken können. In Biogasanlagen muss hier auf eine ausreichende Verweilzeit vor allem im mesophilen Temperaturbereich geachtet werden. Bei der Kompostierung sind Zusätze durch Stroh und Wasser für eine Verbesserung der Keimreduzierung nicht erforderlich. Die Inaktivierung erfolgt vor allem durch das Erreichen bzw. Einstellen hoher Temperaturen und muss deshalb bei allen Behandlungsverfahren als kritischer Verfahrensparameter angesehen werden.

Literaturverzeichnis

1. Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Kasbohrer, A., Kreienbrock, L., Roesler, U. (2013): Longitudinal Monitoring of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase/AmpC-Producing *Escherichia coli* at German Broiler Chicken Fattening Farms. Appl. Environ. Microb., 79(16), 4815-4820
2. Blaak, H., van Hoek, A.H.A.M., Hamidjaja, R.A., van der Plaats, R.Q.J., Kerkhof-de Heer, L., Husman, A.M.D., Schets, F.M. (2015): Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment. Plos One, 10(8)
3. Martens, W., Böhm, R. (2009): Overview of the ability of different treatment methods for liquid and solid manure to inactivate pathogens. Bioresour. Technol., 100(22), 5374-8.

Korrespondenzadresse

Corinna Thomas
Leibniz-Institut für Agrartechnik und
Bioökonomie e.V. (ATB)
Max-Eyth-Allee 100
14469 Potsdam

Telefon:	0331 5699 512
Telefax:	0331 5699 849
E-Mail:	cthomas@atb-potsdam.de

EVALUIERUNG VON MANAGEMENTMAßNAHMEN ZUR REDUKTION ESBL-/ AMPC-BILDENDER ENTEROBAKTERIEN IN DER HÄHNCHENMAST

C. Robé¹, K. Daehre¹, R. Merle², S. Fiedler³, C. Ewers³, S. Guenther⁴, U. Roesler¹

¹ Institut für Tier- und Umwelthygiene, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland

² Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland

³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Deutschland

⁴ Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie, Universität Greifswald, Greifswald, Deutschland

Einleitung

Die Kolonisierung von Masthähnchen mit Extended-Spektrum-Beta-Laktamase (ESBL) und AmpC-Beta-Laktamase- (AmpC-) produzierenden Enterobacteriaceae (im Folgenden als ESBL und AmpC bezeichnet) stellt eine herausfordernde Problematik dar. Bereits bei Eintagsküken konnten diese antibiotikaresistenten Keime nachgewiesen werden. Zudem kann es auch ohne Einsatz von Antibiotika zu einer starken Kolonisierung von Masthähnchen mit ESBL und AmpC während einer Mastperiode kommen. Eine Übertragung auf den Menschen ist über den Kontakt zu kolonisierten Tieren und vor allem durch den Verzehr kontaminierten, nicht ausreichend erhitzten Fleisches möglich. Für Untersuchungen zur Reduktion der Kolonisierung von Masthähnchen wurde ein Broiler Kolonisierungsmodell (Seeder-Bird) etabliert. Mit Hilfe dieses Modells wurden verschiedene Interventionsmaßnahmen auf ihr Potenzial einer Reduktion von ESBL und AmpC hin untersucht.

Material und Methoden

Die Untersuchungen gliedern sich in die Etablierung des Kolonisierungsmodells mit der Bestimmung der minimalen Kolonisierungsdosis und der Durchführung des Seeder-Bird Kolonisierungsmodells und in die darauffolgenden Untersuchungen der einzelnen Interventionsmaßnahmen. Für alle Versuche wurden ESBL-/ AmpC- negative Masthähnchen (Ross 308) konventionell aufgestellt (39 kg/m², kein Enrichment, Futter und Wasser *ad libitum*) und am dritten Lebenstag bivalent mit je einem Stamm ESBL-*E. coli* (CTX-M-15, ST410) und AmpC-*E. coli* (CMY-2, MCR-1, ST10) oral koinfiziert. Die Kolonisierung der Tiere wurde mittels Kloakentupfer über den gesamten Versuchszeitraum überprüft. In einer abschließenden Sektion wurden die Besiedlungsraten von Kropf, Jejunum, Cecum und Colon mit beiden Infektionsstämmen quantifiziert.

Nach erfolgter Dosisfindung wurde das praxisnahe Seeder-Bird Modell mit 20 Tieren etabliert. Lediglich jedes fünfte Tier wurde dafür mit der zuvor ermittelten Kolonisierungsdosis von 10^2 koloniebildenden Einheiten (KbE) *E. coli* inokuliert (Seeder) und bis zu einem Zielgewicht von 2 kg auf die Kolonisierung mit beiden Infektionsstämmen hin untersucht.

Für die darauf folgende Evaluierung der einzelnen Interventionsmaßnahmen wurden 90 Masthähnchen bis zu einem Gewicht von 2 kg konventionell aufgestellt, unter Anwendung jeweils einer Maßnahme. Die Tiere wurden mit der zuvor festgelegten Kolonisierungsdosis von 10^2 KbE *E. coli* und dem Kolonisierungsverhältnis von 1:5 am dritten Lebenstag inokuliert. Getestet wurden folgende Parameter: (1) die Reduktion der Besatzdichte auf 25 kg/m², (2) der Einsatz einer dreifach erhöhten Einstreumenge, (3) die Ansäuerung des Tränkwassers, (4) die Verwendung einer langsam wachsenden Rasse, (5) der Einsatz eines definierten, nicht pathogenen Competitive Exclusion (CE-) Stammes und (6) der Einsatz einer nicht definierten CE-Kultur.

Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die sehr geringe Dosis von 10 ESBL-*E. coli*-Bakterien bzw. von 10^1 KbE ist für eine Kolonisierung von Masthähnchen bereits ausreichend. Auch bei Inokulation nur eines Fünftel der Tiere führt bereits eine Dosis von 10^2 KbE *E. coli* zu einer Kolonisierung aller Tiere in der Gruppe.

Die Untersuchung einzelner Interventionsmaßnahmen zeigte eine stammabhängige Reduktion des ESBL- *E. coli*-Stamms (nicht aber des AmpC- *E. coli*-Stamms) bei Verringerung der Besatzdichte auf 25 kg/m² und bei Einsatz des definierten CE-Stammes. Die Untersuchungen zur Wirksamkeit einer komplexen CE-Kultur sind aktuell nicht abgeschlossen, zeigen jedoch bisher stammunabhängig eine sehr deutliche Reduktion beider eingesetzter Infektionsstämmen. Im Gegensatz dazu hat der Einsatz von angesäuertem Tränkwasser einen negativen Effekt auf die ESBL- und AmpC- Kolonisierung der Tiere.

Die Applikation von Competitive Exclusion Kulturen scheint ein vielversprechender Ansatz für die Reduktion der Kolonisierung von Masthähnchen mit ESBL- und AmpC- *E. coli* zu sein. Demgegenüber erwiesen sich die allermeisten Managementmaßnahmen im untersuchten Tiermodell als nur gering wirksam oder als nicht wirksam hinsichtlich der Kolonisierung und dem Vorkommen von ESBL- und AmpC- *E. coli*.

Korrespondenzadresse

Caroline Robé
Institut für Tier- und Umwelthygiene
Robert-von-Ostertag-Straße 7-13
14163 Berlin

Telefon: 030/83859004
E-Mail: caroline.robe@fu-berlin.de

PRO- UND PHYTOBIOTIKA ZUR VERRINGERUNG ESBL-TRAGENDER ENTEROBAKTERIEN IN GEFLÜGEL

Vahjen, W.¹, Ren, H.¹, Saliu, E.¹, Goodarzi Boroojeni, F.¹, Gerstenkorn, H.² und Zentek, J.¹

¹ Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin, Deutschland

² EW Nutrition, Visbek, Deutschland

Hypothese

Pro- und Phytobiotika sind bekannt für ihre fördernden Wirkungen auf die intestinale Mikrobiota in Nutztieren. Als Hypothese wurde deshalb postuliert, dass Kombinationen von Pro- und Phytobiotika als Synbiotikum die Besiedlung des Darms mit Enterobakterien reduziert. Dieser Effekt sollte dann auch Antibiotika-resistente Enterobakterien betreffen.

Material und Methoden

Im Verlauf des Projekts wurden Methoden entwickelt, um effektiv eine Vielzahl potentieller probiotischer *Lactobacillus* spp. aus Darmproben zu isolieren. Aus über 7000 ursprünglichen Isolaten wurden zwei Isolate (*L. salivarius*, *L. agilis*) ausgewählt, die in-vitro und ex-vivo zu einer starken Hemmung ESBL-tragender *E. coli* Modellstämme führten. Weiterhin wurde allgemein der Einfluss von Stressoren auf die Konjugation von ESBL-Plasmiden in in-vitro und ex-vivo Ansätzen untersucht.

Die Firma EV Nutrition entwickelte fünf verschiedene phytobiotische Produkte für den Einsatz im Geflügel. Diese phytobiotischen Entwicklungsprodukte wurden dann hinsichtlich ihrer Wirkung gegenüber den probiotischen *Lactobacillus* Isolaten mit in-vitro Ansätzen und ex-vivo Inkubationen in Darmproben geprüft. Hierdurch wurden vier synbiotische Kombinationen ermittelt, die im Fütterungsversuch als Einzelkomponente bzw. als Kombinationen eingesetzt wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Im Projekt wurde eine Methode zur umfassenden Isolierung potentieller probiotischer Lactobacillen aus Geflügel etabliert. Ergebnisse zur Übertragung von ESBL-Plasmiden zwischen Enterobakterien deuten darauf hin, dass Stressoren nicht, wie weithin angenommen, zwingend zur Verstärkung eines Gentransfers führen.

Ein Fütterungsversuch zeigte, dass Unterschiede in der Entwicklung der intestinalen Mikrobiota bei Synbiotika keinen additiven Effekt bewirken. Je nach Einzelprodukt bzw. Kombination entwickelte sich die intestinale Mikrobiota unterschiedlich. Den stärksten Effekt auf die Reduktion von Enterobakterien, bzw. Schlüsselemente zum Gentransfer (int11) zeigte eine Kombination von Formulierung L (Phytobiotikum EW Nutrition) und eines *L. agilis*

Probiotikums. Diese Kombination wird in einem abschliessenden Leistungsversuch mit Broilern eingesetzt.

Korrespondenzadresse

Dr. W. Vahjen
Institut für Tierernährung der Freien
Universität Berlin
Königin-Luise-Str. 49
14195 Berlin

Tel.: 03083856496
Fax: 030838458299
E-Mail: wilfried.vahjen@fu-berlin.de

COMPETITIVE EXCLUSION (CE) - EIN WIRKSAMES VERFAHREN ZUR VERMINDERUNG ESBL-/AMPC-BILDENDER ENTEROBACTERIACEAE BEIM GEFLÜGEL

Ulrich Methner

Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Jena

In dem vom Friedrich-Loeffler-Institut zu bearbeitenden Teilprojekt sollten durch „proof of principle-Untersuchungen“ Fragen der Anwendung und Wirksamkeit von kommerziellen Darmflorakulturen (CE-Kulturen) gegen antibiotikaresistente ESBL-AmpC-bildende *Escherichia coli*-Stämme untersucht werden. Neben neuen, bisher nicht verfügbaren wissenschaftlichen Erkenntnissen zur Wirksamkeit von CE-Kulturen nicht definierter Zusammensetzung sollten auch Voraussetzungen für die nachfolgende Entwicklung einer definierten, wirksamen und damit zulassungsfähigen Competitive-Exclusion-Kultur gewonnen werden.

Besiedelung und Exclusion von verschiedenen ESBL-AmpC-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen

Es konnte gezeigt werden, dass *Escherichia coli*-Stämme mit verschiedenen ESBL-AmpC-Genen nach Applikation an Küken in Dosen von nur 10^4 kbE am 2. Lebenstag (LT) zu einer sehr schnellen und starken intestinalen Kolonisation aller Infektionsstämmen bei nicht vorbehandelten Tieren führen. Bis zum 37. LT waren Keimkonzentrationen von mehr als 10^7 kbE/ g Zäkuminhalt nachweisbar.

Die Vorbehandlung der Küken mit der CE-Kultur am 1. LT führte nicht nur zu einer signifikanten ($p < 0,05$), sondern auch zu einer relevanten (ca. 4 bis 5 $\log_{10}$ -Stufen) Verminderung der am 2. LT mit einer Dosis von 10^4 kbE/ Tier applizierten ESBL-produzierenden *Escherichia coli*-Stämme im Vergleich zu nicht vorbehandelten Kontrolltieren. Darüber hinaus wurden auch signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede in der Kolonisationshemmung zwischen den einzelnen Stämmen nachgewiesen. Die Invasion der ESBL-bildenden Infektionsstämmen in innere Organe wurde durch die CE-Kultur vollständig verhindert. Damit konnte die hohe Wirksamkeit der CE-Kultur gegen ESBL-AmpC-bildende *Escherichia coli*-Stämme gezeigt werden.

Wirksamkeit der CE-Kultur gegen hohe Infektionsdosen

Um das Ausmaß der Wirksamkeit einer Darmflorakultur zu erfassen, wurden die Küken nach einer Vorbehandlung mit der CE-Kultur mit ESBL-AmpC-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen in hohen und sehr hohen Infektionsdosen von 10^6 kbE/Tier, 10^7 kbE/Tier oder 10^8 kbE/Tier am 2. LT oral infiziert. Die CE-Kultur reduzierte auch bei diesen sehr hohen Infektionsdosen nicht nur die Besiedelung der ESBL-AmpC-bildenden *Escherichia coli*-Stämme

mit geringem Kolonisationsvermögen, sondern auch die Stämme mit einem sehr starken Vermögen zur Besiedelung des Darmes. Im Vergleich zu nicht vorbehandelten Kontrolltieren betrug die Verringerung der intestinalen Kolonisierung durch die CE-Kultur in Abhängigkeit vom Infektionsstamm ca. 2-4 log₁₀-Stufen. Auch bei den hohen Infektionsdosen wurde die Invasion der ESBL-produzierenden Stämme in innere Organe durch die CE-Kultur vollständig verhindert.

Seeder-bird-Modell zur Wirksamkeitsprüfung der CE-Kultur

Nachdem die erforderlichen grundsätzlichen Informationen zur Wirksamkeit von Darmflorakulturen gegen die intestinale Kolonisierung der SPF-Küken mit den ESBL-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen erarbeitet wurden, erfolgte die Bewertung der Ergebnisse in einem seeder-bird-Infektionsmodell.

Die Vorbehandlung der SPF-Küken mit der Darmflorakultur führte zu einer mit zunehmender Haltungsdauer geringer werdenden zäkalen Besiedelung durch die ESBL-produzierenden *Escherichia coli*-Stämme. Der Unterschied zwischen den vorbehandelten und den nicht vorbehandelten Kontakttieren erhöhte sich auf 5-6 log₁₀-Stufen am 37. Lebenstag. Dieser Unterschied ist nicht nur statistisch signifikant, sondern auch praktisch relevant.

Um dieses Ergebnis weiter zu verifizieren, wurde die Wirksamkeit der CE-Kultur unter Verwendung des „seeder-bird-models“ bei Masthähnchen untersucht. Die Verabreichung der CE-Kultur verhinderte die systemische Invasion der ESBL-Stämme in innere Organe bei den nicht infizierten Kontakttieren ebenfalls vollständig. Die Vorbehandlung der Küken mit der Darmflorakultur führte auch bei den Masthähnchen zu einer mit zunehmender Haltungsdauer geringer werdenden zäkalen Besiedelung durch die ESBL-produzierenden *Escherichia coli*-Stämme. Der Unterschied zwischen den vorbehandelten und den nicht vorbehandelten Kontakttieren war im Vergleich zu den Tieren der Legerichtung etwas geringer aber statistisch signifikant und praktisch relevant.

Damit konnte die hohe, statistisch signifikante und praktisch relevante Wirksamkeit einer CE-Kultur nicht definierter Zusammensetzung gegen die intestinale Besiedelung von verschiedenen ESBL-AmpC-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen sowohl bei Küken der Lege- und Mastrichtung als auch bei Verwendung unterschiedlicher Modelle zur Erregerexposition sehr klar gezeigt werden. Eine praktische Anwendung dieser Kulturen könnte einen wichtigen Beitrag zur Reduzierung von ESBL-AmpC bildenden Enterobacteriaceae in der Masthähnchenproduktion leisten.

Literaturverzeichnis

1. METHNER, U., FRIESE, A., RÖSLER, U. (2019):
 - a. Competitive Exclusion: A tool to combat extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in chickens.
 - b. Res. Vet. Sci. 123, 124-128.
2. METHNER, U. and RÖSLER, U. (2019):
 - a. Efficacy of a competitive exclusion culture against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in broilers using a seeder bird model.
 - b. Res. Vet. Sci. 123, Under Review.

Korrespondenzadresse

PD Dr. Ulrich Methner
Friedrich-Loeffler-Institut
Naumburger Str. 96a
07743 Jena

Telefon: 03641 8042267
ulrich.methner@fli.de

PROBIOTISCHE KULTUREN ALS PROPHYLAXE- UND INTERVENTIONSMASSNAHME GEGEN ESBL-/AmpC-BILDENDE BAKTERIEN BEIM GEFLÜGEL

S. Fiedler¹, C. Heydel¹, H.C. Philipp², T. Arnold², C. Ewers¹

¹Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen

²Boehringer Ingelheim Veterinary Research Center GmbH & Co. KG, Hannover

Einleitung

Die weltweite Zunahme von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien ist zu einer stetig wachsenden, globalen Gesundheitsgefahr geworden. Die WHO betrachtet u.a. die Verbreitung von Extended-Spektrum Beta-Laktamase (ESBL)- und AmpC-β-Laktamase-produzierenden *Enterobacteriaceae* als eine der größten aktuellen Bedrohungen des Gesundheitswesens. Auch das jüngste Auftreten einer plasmid-vermittelten Colistinresistenz ist besorgniserregend. Ein mögliches Reservoir ESBL/AmpC- und MCR-1-bildender *Enterobacteriaceae* bzw. -kodierender Plasmide ist die Nutztierhaltung. Insbesondere bei Geflügel und Geflügelfleischprodukten zeigten verschiedene Studien hohe ESBL-/AmpC-Besiedlungs- bzw. Kontaminationsraten.

Erste wissenschaftliche Studien zeigten, dass „Competitive Exclusion“ (CE)-Kulturen (natürliche, physiologische Mikrobiota gesunder Hühner) wie Aviguard® (MSD Animal Health) zu einer Reduktion der Besiedlung des Geflügeldarms mit Antibiotika-resistenten *Escherichia coli* führen können. Eine Zulassung solcher Präparate ist jedoch aufgrund der nicht definierten bakteriellen Zusammensetzung in Deutschland und vielen anderen Ländern nicht möglich. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer zulassungsfähigen CE-Kultur, d.h. einer weniger komplexen Mischung von definierten Bakterien und die Prüfung des protektiven Effekts dieser CE-Kultur auf die intestinale Kolonisierung von Geflügel mit multiresistenten *E. coli*.

Material und Methoden

Hierzu wurde zunächst ein Küken-Infektionsmodell unter Nutzung von *E. coli*-Isolaten mit verschiedenen Resistenzeigenschaften (CTX-M-1, CMY-2, MCR-1) etabliert. Parallel wurden ca. 1100 Isolate unterschiedlicher Bakterienspezies aus dem Darm von Hühnern aus der Routinediagnostik, Schlachthofproben und den Etablierungsversuchen hinsichtlich ihrer Eignung als Bestandteil einer CE-Kultur untersucht. Auswahlkriterien waren hier phäno- und genotypische Daten zur antimikrobiellen Resistenz und Virulenz der Isolate sowie ihre Fähigkeit, multiresistente *E. coli*-Stämme in ihrem Wachstum und ihrer Adhäsion an Hühnerdarmzellen (Chic-8E11) zu hemmen. Eine auf dieser Basis zusammengestellte CE-Kultur (CE-V) wurde vergleichend mit dem kommerziellen Produkt Aviguard® wie folgt eingesetzt: Eintagsküken (n=36; Ross 308) erhielten CE-V in hoher („CE-V-high“; $2,1 \times 10^9$ KBE)

oder niedriger („CE-V-low“; $2,1 \times 10^7$ KBE) Dosierung via Kropfinstillation. Weiteren Tiergruppen wurde Aviguard® in zwei Dosierungen („Avi-high“/„Avi-low“ [1:100]) auf gleichem Wege verabreicht. Am 2. Lebenstag erhielten alle Tiere einen AmpC- (CMY-2) & MCR-1- produzierenden *E. coli* (IHIT34709/10717; $2,8 \times 10^5$ KBE) via Kropfinstillation. Dessen Ausscheidung wurde über die 14-tägige Versuchsdauer in Kloakentupfern bzw. seine Kolonisierung im Caecum-Inhalt am Versuchsende erfasst. Der Einfluss von CE-V und Aviguard® auf die Mikrobiota der Tiere wurde an den Tagen 0, 4, 8 und 14 mittels 16S rRNA-Gen-Sequenzierung untersucht.

Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die hier etablierte Probiotika-Kultur setzt sich aus einem definierten, nicht pathogenen gramnegativen CE-Stamm sowie je zwei Isolaten der Familien der Enterococcaceae und Lactobacillaceae zusammen. Alle Isolate waren sowohl einzeln als auch kombiniert in der Lage, die Adhäsion des Infektionsstammes *E. coli* IHIT34709/10717 an Hühnerdarmzellen zu reduzieren. Zudem konnten weitere potentielle CE-Kandidaten anhand der gewählten Kriterien für zukünftige Studien identifiziert werden.

Im Hühner-Kolonisierungsversuch konnte für alle Gruppen (Aviguard & CE-V) eine gegenüber der Kontrollgruppe gemessene Reduktion (1-3 Log₁₀-Stufen je nach Präparat und Dosis) der Keimzahlen des CMY-/MCR-1-positiven *E. coli* im Caecum-Inhalt nachgewiesen werden. Die Komposition der Mikrobiota der nicht und mit CE-V behandelten Tieren war an allen Untersuchungstagen auf Ebene der Bakterien-Phyla und -Ordnungen vergleichbar. Die mit Aviguard® behandelten Tiere zeigten eine komplexere Zusammensetzung der Mikrobiota und einen gegenüber den anderen Gruppen höheren Anteil an Bacteroidales, Burkholderiaceae und Selenomonadales. Signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht festgestellt. Die Ergebnisse bestätigen das große Potential von CE-Präparaten als Maßnahme zur Reduzierung multiresistenter Bakterien bei Geflügel. So war der Einsatz des in CE-V enthaltenen gramnegativen CE-Stammes im vom Projektpartner ITU (AP3, Freie Universität Berlin) etablierten Küken-Kolonisierungsmodell eine der wenigen Interventionsmaßnahmen, die zu einer Reduzierung der Kolonisierung des Hühnerdarms mit multiresistenten *E. coli* geführt hat. Die Applikation von CE-V in unserem *in vivo*-Versuch hat weder die Komposition der Mikrobiota noch die Performance der Tiere negativ beeinflusst. Inwieweit CE-V und andere probiotische Kulturen, die auf Basis der in diesem Projekt gewonnen Erkenntnisse generiert werden können, nicht nur zur Reduktion multiresistenter sondern auch pathogener Bakterien führen können, sollte dringend Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein. Auch ein Transfer der Erkenntnisse auf andere lebensmittelliefernde Tierarten, beispielsweise das Schwein, stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Bekämpfung der Ausbreitung multiresistenter *E. coli* dar.

Korrespondenzadresse

Christa Ewers
Institut für Hygiene und
Infektionskrankheiten der Tiere
Frankfurter Str. 85-89
35392 Gießen

Telefon: 0641/9938300
Telefax: 0641/9938309
E-Mail:
christa.ewers@vetmed.uni-giessen.de

Maßnahmen zur Minimierung von ESBL-bildenden Enterobakterien im Rahmen der Schlachtung, Zerlegung und Verpackung von Mastgeflügel – Teil 1

Nina Langkabel¹, Janine Dzierzon¹, Lüppo Ellerbroek² und Diana Meemken¹

¹Institut für Lebensmittelsicherheit und –hygiene, AG Fleischhygiene, Freie Universität Berlin

²Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), Referat, Fleischhygiene, Lebensmittelhygiene, Berlin

Ziel des Arbeitspaketes 6 war es, den Transfer bzw. die Übertragung von antibiotikaresistenten Bakterien oder deren Eigenschaften von der Tierhaltung bis zum Endprodukt zu reduzieren. Dabei wurde der Fokus der Untersuchungen nicht nur auf antibiotikaresistente Keime, sondern auch auf die Gehalte an Enterobakterien als ein Hygieneparameter im Schlacht- und Verarbeitungsprozess gelegt.

Einleitung

Durch die Automatisierung des Schlachtprozesses ist eine Reduktion der Keimausbreitung auf Schlachtbetriebsebene möglich. Als Prozessstufe mit dem größten Einfluss auf eine Reduktion der Gesamtkeimzahl konnte von STEPHAN (2014) der Rupfprozess identifiziert werden. Die beiden vorgelagerten Prozessschritte „Nüchterung“ und „Brühen“ können ebenfalls Einflussfaktoren für die Schlachthygiene sein. Die Nachweise von Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-bildenden *E. coli* in Geflügelfarmen und auf Schlachtbetriebsebene (Laube et al. 2014, Pacholewicz et al. 2015) zeigen, dass Geflügelfleischprodukte eine potentielle Quelle für den Übertrag von antibiotikaresistenten Bakterien in den Humanbereich sein können.

Einfluss der Nüchterungszeit

Um Darmzerreißen durch gefüllte Därme bei der maschinellen Entnahme zu vermeiden, Gefiederverschmutzungen durch Kotabsatz während des Aufenthalts in den Containern zu minimieren sowie um die Tiere während des Transports körperlich zu entlasten, wird Geflügel vor dem Transport zum Schlachtbetrieb in der Regel das Futter entzogen (Nunes 2005, Wabeck 1972). Diese so genannte „Nüchterungszeit“ setzt sich nach dem Welfare Quality Assessment Protocol for Poultry (Welfare Quality® 2009) aus der Zeit des Futterentzuges im Haltungsbetrieb, der Transportzeit und der Wartezeit im Schlachtbetrieb zusammen. Zusammenfassend hat die Dauer der Nüchterungszeit nicht nur Auswirkungen auf das Tierwohlbefinden, sondern ist auch ein Faktor, der die Kontamination im Schlachtbetrieb direkt und indirekt mitbestimmt.

Als optimale Dauer der Nüchterungszeit hat sich in der Vergangenheit bislang ein Zeitraum von 8 bis 12 Stunden etabliert, um z.B. den Koteintrag in das Brühwasser möglichst gering zu halten (Northcutt 2010, Thompson und Applegate 2008, Fries 2001, Warbeck 1972).

Beim Teilprojekt AP 6.1 „Einfluss der Nüchterungszeit auf die Schlachtprozesshygiene“ wurden Halshautproben von Tieren, die 6, 8 bzw. 10 Stunden genüchtert waren, im Anschluss an die Schlachtung a) vor und b) nach der Kühlung beprobt. Die Proben wurden hinsichtlich der Gesamtkeimzahl (GKZ), des Gehaltes an Enterobakterien (EB) und ESBL-bildenden *E. coli* untersucht.

Zwischen den einzelnen Nüchterungszeiten konnte weder vor noch nach der Kühlung ein statistisch signifikanter Einfluss auf die untersuchten Parameter GKZ, EB und ESBL-bildende *E. coli* gezeigt werden.

Bei den nachgewiesenen ESBL-bildenden *E. coli* wurden mittels Multiplex-PCR nach CLERMONT et al. (2013) die Phylogruppen bestimmt. Dabei wurde die Phylogruppe B1 am häufigsten nach der Kühlung nachgewiesen. Die im Zusammenhang mit Harnwegsinfektionen beim Menschen nachgewiesenen Phylogruppen B2 und D (Picard et al. 1999, Jakobsen et al. 2010, Jakobsen et al. 2011) wurden insgesamt nur bei zwei bzw. null Isolaten nachgewiesen, wobei ein Isolat der Phylogruppe B2 nach der Kühlung vorkam.

Es wurden jeweils nur vier Herden pro Nüchterungszeit beprobt, sodass sich insgesamt nur eine geringe Stichprobe pro Nüchterungszeit ergibt. Deshalb ist geplant, den Einfluss einer deutlich kürzeren Nüchterungszeit im Vergleich zu den üblichen Nüchterungszeiten mit einer größeren Stichprobe in zukünftigen Projekten zu überprüfen.

Einfluss verschiedener Brühverfahren

Ziel des Brühprozesses ist eine leichtere Entfernung der Federn im nachfolgenden Rupfprozess (Fries 2001). Das Brühen kann jedoch mit einer gleichzeitigen Kontamination des Brühwassers mit Kot und den darin enthaltenen Erregern einhergehen (Fehlhaber 2001). Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Brühverfahren entwickelt. Ziel jeder Fortentwicklung sollte es daher sein, die Kontamination des Brühwassers so gering wie möglich zu gestalten. Neben der Anwendung verschiedener Brühtanksysteme, bei denen auch am Einsatz einer Dekontamination des Brühwassers gearbeitet wird, werden auch andere technische Alternativen, wie der Einsatz von heißem Wasserdampf, erprobt. Dieses Verfahren wurde bereits bei der Schlachtung von Puten und Perlhühnern erfolgreich eingesetzt (Lillard et al. 1973). Ziel ist es hier, denselben Effekt an den Federfollikeln zu erreichen, ohne dass die Tierkörper direkten Kontakt zum Wasser haben. Auf diesem Wege sollen Kreuzkontaminationen reduziert werden. Eine Weiterentwicklung dieser Heißluftbrühtechnik stellt der sogenannte Aeroscalder® dar.

Beim Teilprojekt AP 6.2 „Einfluss der Brühtechnik“ wurden über zwei Jahre insgesamt 48 Mastgeflügelherden an drei Schlachtbetrieben mit unterschiedlichen Brühtechniken beprobt:

1. konventioneller Brühtank mit low-scalding-Verfahren

2. konventioneller Brühtank mit zwischengeschalteter Pasteurisierung des Brühwassers während des Betriebs
3. Aeroscalder®

Bei allen drei Brühverfahren war die Brühtemperatur mit 53 °C und 56 °C vergleichbar. Es wurden Brusthautproben entlang des gesamten Fleischgewinnungsprozesses von je vier Einzeltieren pro Prozessposition entnommen: a) vor dem Brüher, b) nach dem Brüher, c) nach dem Rupfer, d) vor der Kühlung und e) nach der Kühlung und anschließend auf den Gehalt an Enterobakterien und den Nachweis von ESBL-bildenden *E. coli* untersucht.

Alle Brüher reduzierten die Mittelwerte der Enterobakterien auf der Brusthaut von vor dem Brühen bis nach dem Rupfen deutlich um 2,8 bis 3,6 log/g. Dies kann mit dem Entfernen der Federn, die teilweise der Brusthaut mit Kot anhaften, zusammenhängen.

Eine Reduktion der Mittelwerte der Enterobakterien auf der Brusthaut nach dem Brühen um 0,7 log/g wurde durch den konventionellen Brüher erreicht. Bei den beiden anderen Brühverfahren wurde hier eine maximale Reduktion der Mittelwerte der Enterobakterien um 0,2 log/g erreicht.

Die Nachweishäufigkeit der einzelnen Gene der nachgewiesenen ESBL-Isolate bei den Brusthautproben stellte sich wie folgt dar: CTX (70 %, 216/309) > TEM-52-Gen (15 %, 46/309) > SHV-12-Gen (15 %, 47/309).

Beim konventionellen Brüher mit Pasteurisierung des Brühwassers wurden nach der Kühlung am wenigsten ESBL-bildende *E. coli*-Isolate nachgewiesen.

Mittels Multiplex-PCR nach CLERMONT et al. (2013) wurden die Phylogruppen bestimmt, wobei die Phylogruppen D/E und B1 insgesamt am häufigsten nachgewiesen wurden. Der Nachweis der Phylogruppe B2 erfolgte in zwei Fällen nach der Kühlung bei beiden Brühern mit konventionellem Brühverfahren. Insgesamt wurde B2 nur in geringen Anteilen nachgewiesen, außer beim konventionellen Brüher mit Pasteurisierung, bei dem Nachweise nach dem Rupfer und vor der Kühlung höhere Anteile zeigten. Die Phylogruppen C, D und E wurden nicht nachgewiesen.

Im hier gewählten Beprobungszyklus wurden keine Einzeltierbeprobungen durchgeführt. Eine Einzeltierbeprobung vor und nach dem Brüher könnte die Aussagekraft im Hinblick auf den Einfluss des Brühers sowohl auf den Enterobakteriengehalt allgemein als auch auf den Gehalt an ESBL-bildenden *E. coli* verbessern, sodass dies in Folgeprojekten untersucht werden soll.

Literaturverzeichnis

- CLERMONT, O., J. K. CHRISTENSON, E. DENAMUR, and D. M. GORDON (2013):** The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports* 5 (1), 58 – 65
- FEHLHABER, K. (2001):** 12 Mikrobiologie des geschlachteten Geflügels. In: R. Fries, V. Bergmann, K. Fehlhaber (Hrgs.): *Praxis der Geflügelfleischuntersuchung*. Schlütersche GmbH & Co. KG, Verlag und Druckerei, Hannover, S.197 – 205
- FRIES, R. (2001):** 5 Geflügelfleischgewinnung. In: R. Fries, V. Bergmann, K. Fehlhaber (Hrgs.): *Praxis der Geflügelfleischuntersuchung*. Schlütersche GmbH & Co. KG, Verlag und Druckerei, Hannover, 37 – 46
- JAKOBSEN, L., A. KURBASIC, L. SKJØT-RASMUSSEN, K. EJRNÆS, L. J. PORSBO, K. PEDERSEN, L. B. JENSEN, H.-D. EMBORG, Y. AGERSØ, K. E. P. OLSEN, F. A. AARESTRUP, N. FRIMODT-MØLLER, and A. M. HAMMERUM (2010):** *Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. *Foodborne Pathogens and Disease* 7 (5), 537 – 546
- JAKOBSEN, L., P. GARNEAU, A. KURBASIC, G. BRUANT, M. STEGGER, J. HAREL, K. S. JENSEN, R. BROUSSEAU, A. M. HAMMERUM, and N. FRIMODT-MØLLER (2011):** Microarray-based detection of extended virulence and antimicrobial resistance gene profiles in phylogroup B2 *Escherichia coli* of human, meat and animal origin. *Journal of Medical Microbiology* 60, 1502 – 1511
- LAUBE, H., A. FRIESE, C. VON SALVIATI, B. GUERRA, and U. RÖSLER (2014):** Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Veterinary Microbiology* 172, 519 – 527
- LILLARD, H. S., A. A. KLOSE, R. I. HEGGE and V. CHEW (1973):** Microbiological comparison of steam-scalded (at sub-atmospheric pressure) and immersion-scalded broilers. *Journal of Food Science* 38, 903 – 904
- NORTHCUTT, J. K. (2010):** Factors influencing optimal feed withdrawal duration. The University of Georgia Cooperative Extension, Bulletin 1187, 1 – 7
- NUNES, F. (2005):** Feed withdrawal to reduce carcass contamination. *World Poultry* 21 (1), 36 – 38
- PICARD, B., J. S. GARCIA, S. GOURIOU, P. DURIEZ, N. BRAHIMI, E. BINGEN, J. ELION, and E. DENAMUR (1999):** The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity* 67 (2), 546 – 553
- PACHOLEWICZ, E., A. LIAKOPOULOS, A. SWART, B. GORTEMAYER, C. DIERIKX, A. HAVELAAR, and H. SCHMITT (2015):** Reduction of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* through processing in two broiler chicken slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology* 215, 57 – 63
- STEPHAN, R. (2014):** Wie entwickeln sich die Keimzahlen im Schlachtprozess? *Schweizer Geflügelzeitung* 12/14, 12 – 13

THOMPSON, K. L. and T. J. APPLGATE (2008): Optimizing feed withdrawal programs. Purdue University, Purdue Extension, AS-576-W, New 4/08

WABECK, C. J. (1972): Feed and water withdrawal time relationship to processing yield and potential fecal contamination of broilers. Poultry Science 51, 1119 – 1121

WELFARE QUALITY® (2009): Welfare Quality assessment protocol for poultry (broilers, laying hens). Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands

Korrespondenzadresse

Dr. med. vet. Nina Langkabel
Institut für Lebensmittelsicherheit und –
hygiene, AG Fleischhygiene
Zentrum für Veterinary Public Health
FB Veterinärmedizin, FU Berlin
Königsweg 67, Haus 22
14163 Berlin

Tel: 030 / 838 52 793

Fax: 030 / 838 452 793 / 790

E-Mail: nina.langkabel@fu-berlin.de

Maßnahmen zur Minimierung von ESBL-bildenden Enterobakterien im Rahmen der Schlachtung, Zerlegung und Verpackung von Mastgeflügel – (Teil 2)

Niels Bandick, Christian Thomas, Imke Wulsten und Kerstin Stingl

Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Biologische Sicherheit, Berlin

Einleitung

Das BfR ist im EsRAM Projekt über mehrere Teilprojekte vertreten, die über eine verbesserte Detektion der Bakterien ohne Kultivierung, Entwicklung praxisnaher Desinfektionsmittelprüfungen und Verpackungsstrategien für das Geflügelfleisch Erkenntnisse gewonnen haben. Erste Schritte für geeignete Maßnahmen konnten vielfach nur kleine Wirkungen erbringen, sind aber für die Risikobewertung von hohem Interesse.

Reinigungs- und Desinfektionssysteme (Cleaning in place, CIP) für Ausnehmegeräte und Zerlegungseinrichtungen

Schwerpunkt war in diesem Teilprojekt AP 6.3 die Entwicklung einer Desinfektionsmittel-Prüfmethodik in Anlehnung an die klassischen Desinfektionsmittelprüfungs-Vorschriften der DVG bzw. EN-CEN für solche speziellen Desinfektionsverfahren mit sehr kurzer Einwirkzeit (2-5 sec.) und bei niedriger Umgebungstemperatur (7°C), Schlagwort Cleaning in Place/CIP-Verfahren. Im Fokus stand als in praxi gängige Wirksubstanz zu Beginn der Untersuchungen ein Peressigsäurepräparat, im Folgenden fand ein Screening anderer Substanzen im Vergleich statt, dabei wurden Triaminlösung, eine quartäre Ammoniumverbindung, eine Peressigsäurelösung mit NaOH und anionischen Tensiden, Zitronensäure, Ameisensäure, Milchsäure und Natriumchlorit berücksichtigt. Beobachtet wurde dabei die Wirkung auf ESBL-bildende *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und nicht resistente *E. coli*. Das Screening erbrachte lediglich für das Peressigsäurepräparat und Milchsäure schwach positive Ergebnisse hinsichtlich einer Wirksamkeit unter spezifischen experimentellen Bedingungen. Eine Erprobung in praxi erbrachte hierzu deutlichere Ergebnisse.

Entwicklung keimreduzierend wirkender Herstellungs- und Verpackungsverfahren zur Verbesserung des Hygienestatus von Geflügelfleisch und -zubereitungen

In diesem Teilprojekt AP 6.4 stand zum Einen die Prüfung einer reduzierenden Wirkung dreier verschiedener Gasmischungen für Verpackungen mit sog. Modified Atmosphere Packaging (MAP) und zum Anderen der vermehrungsreduzierende Effekt von Marinaden auf ESBL-bildende *E. coli* bei Lagertemperatur von 3°C im Mittelpunkt. Die MAP waren jeweils CO₂, N₂ und O₂-dominiert. Im Mittelwert der Ergebnisse zeigte sich ein tendenziell verlangsamtes Wachstum der Parameter Gesamtkeimzahl, Enterobacteriaceae und Pseudomonaden unter

dem Einfluss der modifizierten Atmosphären. Die stärkste Verlangsamung wurde durch das CO₂-Gemisch hervorgerufen. Jedoch war kein deutlicher Unterschied in der Reduktion des inokulierten ESBL-bildenden *E. coli* festzustellen. Im Mittelwert nahm dessen Konzentration unter allen untersuchten Atmosphären tendenziell ab. Eine Vergrößerung des Gasvolumens in Relation zur Einwaage verbesserte das Ergebnis geringfügig.

Zum Effekt von Marinaden auf die Entwicklung von Mikroorganismen auf Hähnchenfleisch wurde die Wirkung einzelner Marinadenbestandteile, wie z. B. organische Säuren und würzende Elemente, auf einen ESBL-bildenden *E. coli*. Untersuchungsparametern aerobe mesophile Keimzahl, Enterobacteriaceae und *Pseudomonas* spp untersucht. Die verwendeten Marinadenbestandteile zeigten eine vermehrungsreduzierende Wirkung gegenüber unbehandeltem Hähnchenfleisch. Eine Kombination der Bestandteile erbrachte keine Verbesserung der Wirkung. Die Sensorik veränderte sich dabei allerdings stark.

Erweiterte Wirksamkeitsprüfung der Reduktionsstrategien mittels Nachweises intakter und potentiell infektiöser Einheiten (IPIE)

Die Wirksamkeit von physikalischen und chemischen Verfahren zur Verringerung von antibiotikaresistenten Keimen im Schlachtprozess wird normalerweise anhand der Reduktion der anzüchtbaren Bakterien (Kolonie-bildende Einheiten = KbE) beurteilt. Da Keime durch Stresseinwirkung ihr Potential verlieren können, in vitro auf Agar-Nährmedien zu wachsen, kann es sich hierbei aber auch nur um eine scheinbare Reduktion lebender Bakterien handeln.

Im Rahmen des Teilprojektes AP 6.5 wurde eine Detektionsmethode entwickelt, die lebende *E. coli* (einschließlich resistenter ESBL-Bildner) ohne Anzucht quantifiziert. Die Bestimmung der Anzahl erfolgt mittels Realtime-PCR mit einem vorgeschalteten lebend/tot-Differenzierungsprozess. Die Methode wurde auf Praxistauglichkeit optimiert und kam für Proben aus den entsprechenden Teilprojekten und in Proof-of-Principle-Versuchen zur Anwendung. In einem praxisnahen Hühnerhaut-Modell wurden die in dem Konsortium detektierten Maßnahmen zur Keimreduktion (Anwendung von Peressigsäure, Milchsäure, Natriumhypochlorit, Tiefkühlen u.a.) mittels dualer Quantifizierung (Lebend-Realtime-PCR und KbE-Methode) überprüft.

Diese Methode kann für eine erweiterte Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsstrategien zukünftig validiert und genutzt werden und soll den Nachweis lebender Bakterien und damit die Lebensmittelsicherheit verbessern.

Korrespondenzadresse

Dr. Niels Bandick
Bundesinstitut für Risikobewertung
Max Dohrn-Straße 8-10
10589 Berlin

Telefon: +49 30 18412 24100
E-Mail: niels.bandick@bfr.bund.de

TIERE, TEXTE, THEORIEN

- DREI PERSPEKTIVEN AUF MASSNAHMEN ZUR REDUKTION VON ESBLs IN DER GEFLÜGELFLEISCHPRODUKTION

Michaela Projahn¹, Evelyne Becker¹, Guido Correia-Carreira¹, Sascha Bulik¹, Annemarie Käsbohrer¹

¹ Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Biologische Sicherheit, Berlin, Deutschland

Einleitung

Das Vorkommen von antibiotikaresistenten, insbesondere Extended-Spektrum Beta-Laktamase- (ESBL-) und AmpC-produzierenden Enterobakterien sorgt für vermehrte Probleme im humanmedizinischen Gesundheitsbereich insbesondere bei der Therapie von Infektionen bei prädisponierten Personen. Das vermehrte Auftreten solcher Resistenzen steht in Verbindung mit einem nicht sachgerechten Umgang mit Antibiotika. Ein Transfer von Keimen mit Antibiotikaresistenzen von Lebensmittel liefernden Tieren auf den Menschen kann nicht ausgeschlossen werden. Das Vorkommen von kommensalen ESBL-/AmpC-produzierenden *Escherichia coli* wird immer wieder im Bereich der Geflügelhaltung und bei Geflügelfleisch nachgewiesen [1]. Der EsRAM-Verbund hat es sich zur Aufgabe gemacht, Maßnahmen zur Begrenzung der Verbreitung und Verschleppung solcher resistenten Keime zu entwickeln bzw. deren Wirksamkeit zu überprüfen.

Methoden

Das Arbeitspaket (AP) 7 beschäftigt sich im Rahmen des EsRAM-Verbundes mit der übergreifenden Zusammenführung des Wissensstandes und der Abschätzung der Wirksamkeit verschiedener Maßnahmen aus den Forschungsaktivitäten im Verbund („Tiere“) und der Literatur („Texte“) für die Bereiche Primärproduktion und Schlachthof. Dafür wurden alle verfügbaren Ergebnisse zusammengetragen und in Maßnahmenkatalogen aufbereitet. Um die Entwicklung der Prävalenz während der Mastphase im Stall abzuschätzen und die Übertragung während des Schlachtprozesses besser quantifizieren zu können, wurden mathematische Modelle entwickelt („Theorien“). Die interaktive Auswahl möglicher Interventionsmaßnahmen soll Auskunft geben über zu erwartende Reduktionseffekte im Mastverlauf bzw. während des Schlachtprozesses.

Ergebnisse und Ausblick

Für den Bereich Primärproduktion wurden 229 Maßnahmen aus der Literatur, aus Handlungsempfehlungen und nationalen Bekämpfungsprogrammen extrahiert und in die vier Hauptkategorien Infrastruktur, Mastdurchführung, Hygiene und medizinische Versorgung sowie 19 Unterkategorien gruppiert. In der wissenschaftlichen Literatur konnten 25 Veröffentlichungen mit Maßnahmen zur quantitativen Reduktion von (ESBL-/AmpC-produzierenden) Enterobakterien gefunden werden. Diese lassen sich den spezifischen Unterkategorien Reinigung und Desinfektion, Competitive Exklusion, Futterzusatzstoffe sowie Einstreu/Mist zuordnen.

Die Ergebnisse von Projektpartnern im EsRAM-Verbund und die Literaturdaten zeigen im Wesentlichen eine ähnliche Tendenz, allerdings werden die Ergebnisse von der konkreten Studiendurchführung beeinflusst. So werden für gleichartige Maßnahmen Unterschiede im Reduktionseffekt, sowohl im positiven als auch im negativen Bereich beschrieben. Ein erstes Modell zur Simulation der Kolonisierung der einzelnen Masthühner im Maststall wurde basierend auf bereits publizierten Ansätzen [2-4] entwickelt. Ziel ist es, weitere Schutzmaßnahmen bei der Simulation berücksichtigen und so deren Effekte abschätzen zu können.

Für den Bereich Schlachthof wurden 73 veröffentlichte Studien identifiziert und die dort untersuchten Maßnahmen hinsichtlich ihrer quantitativen Reduktionswirkung analysiert. Da keine Studien öffentlich verfügbar sind, die sich spezifisch mit der Reduktion von ESBL-Produzenten befassten, wurde hierbei der Fokus auf *E. coli*, coliforme Keime und Enterobakterien gelegt. Auch hier zeigten sich je nach Studie unterschiedliche Wirkungsspektren der untersuchten Maßnahmen, angefangen von Reduktionen um 1-3 log₁₀ Stufen bis hin zu Erhöhung der Keimzahlen um bis zu 1 log₁₀ Stufe [5]. Für den Schlachthofbereich wurde ebenfalls ein Modell für *E. coli* entwickelt basierend auf Nauta et al., 2005 [6], welches die Erregerkonzentration an verschiedenen Stufen des Schlachtprozesse simuliert. Zusätzlich erlaubt das Modell, anhand von Ergebnissen aus den EsRAM-Experimenten und der Literatur, die Wirkung verschiedener Maßnahmen auf die Keimkonzentration auf der Karkasse nach der Kühlung abzuschätzen.

Die Ergebnisse aus den Teilbereichen Geflügelmast und Schlachthof zeigen jedoch, dass es keine einfachen Maßnahmen gibt, um ESBL-bildende Enterobakterien wirksam zu reduzieren oder gar zu eliminieren. Vielmehr erscheint ein Bündel von Maßnahmen erforderlich zu sein, die auf verschiedenen Stufen entlang der gesamten Kette zum Einsatz kommen müssen und für deren Einsatz auch die jeweiligen Besonderheiten vor Ort beachtet werden müssen.

Literaturverzeichnis

1. Kaesbohrer, A., et al., *Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing E. coli in food in Germany*. Veterinary Microbiology, 2019. **233**: p. 52-60.
2. Huijbers, P.M.C., et al., *Transmission dynamics of extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase-producing Escherichia coli in a broiler flock without antibiotic use*. Prev Vet Med, 2016. **131**: p. 12-19.
3. Plaza Rodriguez, C., G. Correia Carreira, and A. Kasbohrer, *A Probabilistic Transmission Model for the Spread of Extended-Spectrum-beta-Lactamase and AmpC-beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli in the Broiler Production Chain*. Risk Anal, 2018.
4. Graesboll, K., et al., *How fitness reduced, antimicrobial resistant bacteria survive and spread: a multiple pig-multiple bacterial strain model*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100458.
5. Projahn, M., et al., *Reviewing Interventions against Enterobacteriaceae in Broiler Processing: Using Old Techniques for Meeting the New Challenges of ESBL E. coli?* BioMed Research International, 2018.
6. Nauta, M., I. van der Fels-Klerx, and A. Havelaar, *A poultry-processing model for quantitative microbiological risk assessment*. Risk Anal, 2005. **25**(1): p. 85-98.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Annemarie Käsbohrer
Bundesinstitut für Risikobewertung
Max-Dohrn-Straße 8-10
10589 Berlin

Telefon: 030/18412-24300
E-Mail:
annemarie.kaesbohrer@bfr.bund.de