

Luquasta I

Untersuchungen zum Keimspektrum **IM STALL** mit **Fokus auf Staphylokokken** bei **Geflügel und Schweinen**

Emissionsbeurteilung in der Nutztierhaltung, online, 05.04.2022

HBLFA Raumberg-Gumpenstein

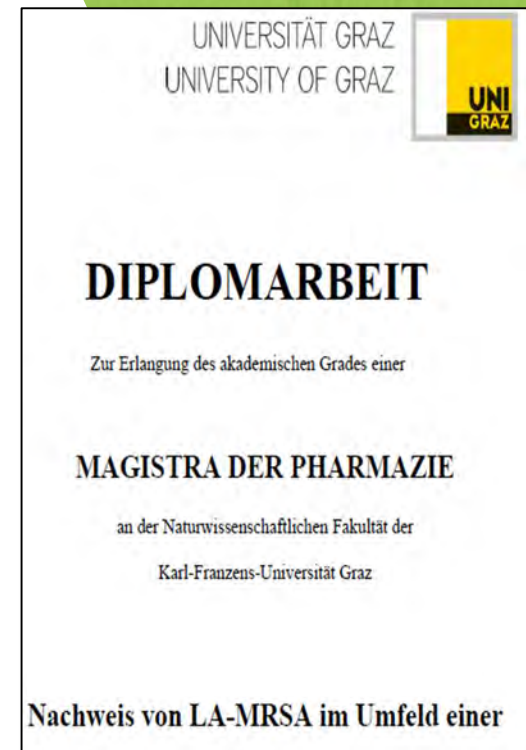
Sabine Köck¹, Tea Mišković¹, Jakob Kedwani¹, Thomas Eirisch¹ & Michael Kropsch²

¹ Diplomandinnen und Diplomanden der Med. Univ. Graz, D&F Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin

² Abteilung Tierhaltungssysteme, Technik und Emissionen, HBLFA für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein

Luquasta - Diplomarbeiten

- zur(m) Magistra/Magister der Pharmazie
- 18 DA in den Projektjahren 2018 – 2021
- 7 davon in Raumberg-Gumpenstein
- **Sabine Köck - Schwein**
- **Jakob Kedwani - Schwein**
- **Tea Mišković - Geflügel**
- **Thomas Eirisch - Geflügel**
- Qendresa Beqiraj
- Merna Massoud
- Neda Karimi-Aghche



Staphylococcus aureus - Steckbrief

- gram-positives Bakterium
- vorkommen bei Menschen und Tieren
 - ca. 30 % der Bevölkerung sind besiedelt
- wichtigster bakterieller Infektionserreger
- antibiotika-resistente Variante: **MRSA**
- MRSA: Methicillin-resistenter *S. aureus*
 - bekanntester „multiresistente“ Keim
 - in der Öffentlichkeit
 - in der Forschung mit guter Datenbasis
- drei Sequenztypen: **HA-MRSA, CA-MRSA, LA-MRSA**

HA-MRSA

- Hospital-associated MRSA
- Reservoir = Mensch
- Risikofaktoren: Krankenhaus- oder Pflegeheimaufenthalte, höheres Alter, lange Antibiotika-Gabe
- Auftreten ab 1961
- Virulenz: wie bei Methicillin-sensiblen *S. aureus*

CA-MRSA

- Community acquired MRSA
- Reservoir = Mensch
- Risikofaktoren: Reisen, Kontaktsport,
beengte Räumlichkeiten
- Auftreten ab 1980er Jahre
- Virulenz: hoch, beinahe alle besitzen PVL-Toxin
(porenbildendes Toxin, beeinträchtigt Abwehr)

LA-MRSA

- Livestock-associated MRSA
- Reservoir = Nutztiere (Schweine, zunehmend Haus- und Hobbytiere)
- Risikofaktoren: Kontakt zu besiedelten Tieren
- Auftreten ab 2001
- Virulenz: geringer, im Vergleich zu HA/CA-MRSA

Staphylococcus aureus - Infektionen

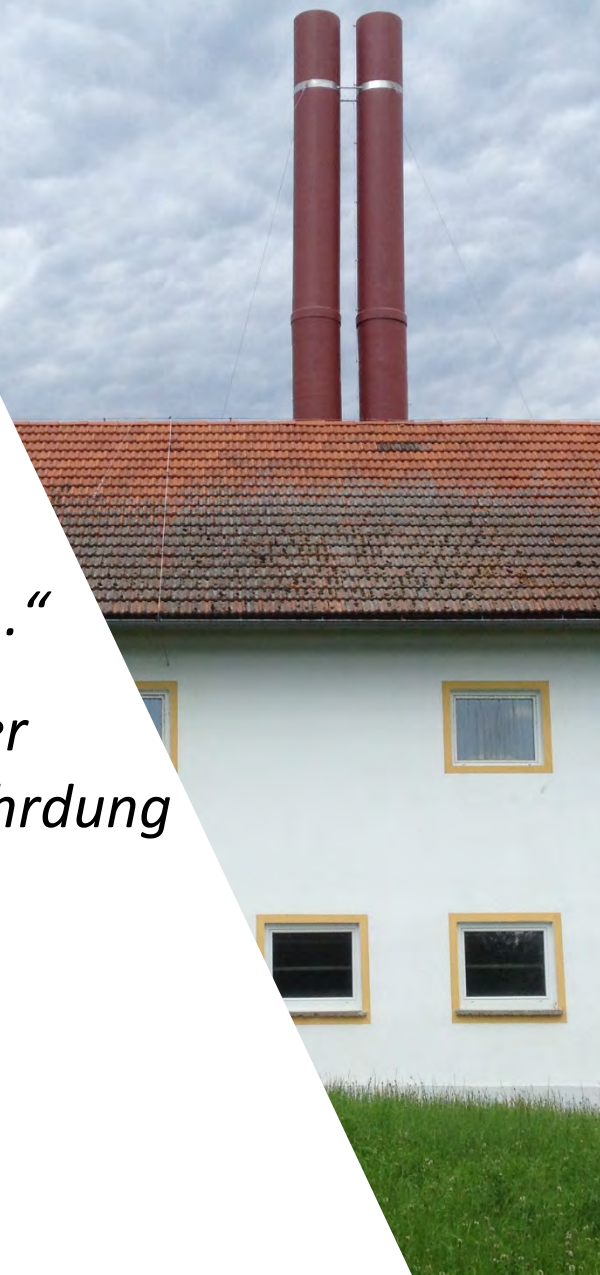
- Haut-, Wund-, Knochen- und Weichteilinfektionen
- Lungenentzündung
- Harnwegsinfektionen
- Toxisches Schocksyndrom (Gynäkologie)
- Sepsis (Blutvergiftung)

Staphylococcus aureus - Übertragung

- Kontaktinfektionen
 - **Hauptübertragungsweg**
 - Mensch-zu-Mensch Kontakt
 - Tier-zu-Mensch Kontakt
 - kontaminierte Oberflächen
- Aerogen/Luft
 - selten, aber möglich
 - Staub
 - Aerosolbildung infizierter Flüssigkeiten (Niesen, operative Eingriffe ...)

Problemstellung - Einschreiter

- *„... landw. Betriebe sind Brutstätten multiresistenter Keime (MRSA)“*
- *„... eine Infektion mit MRSA bedeutet eine schwerwiegende Diagnose Besiedelung umso höher, je größer der Tierbestand ist ...“*
- *„... Keime gelangen ... in die Umgebung der Stallanlage und stellen ... potentielle Gefährdung unserer Gesundheit dar ...“*
- *„... Gesundheitsgefährdung ... liegt in der begründeten krankmachenden Angst ...“*



S. Köck & J. Kedwani

Bioaerosolmessungen in einem Schweinemastabteil über den Zeitraum einer Mastperiode

Diplomarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades einer Magistra der
Pharmazie

Begutachter:

Ao.Univ.-Prof.Mag.Dr.rer.nat Franz Bucar

BetreuerIn:

Priv.-DozⁱⁿMag.^aDr.ⁱⁿrer.nat. Doris Haas
Mag.rer.nat.Dr.scient.med. Herbert Galler

Diagnostik- und Forschungsinstitut für Hygiene, Mikrobiologie und
Umweltmedizin
Neue Stiftingtalstraße 6,8010 Graz

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Karl-Franzens-Universität Graz
Universitätsplatz 4/1, 8010 Graz

Graz 2019

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Nährmedien

Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien

Aufgrund der geringen Größe von Mikroorganismen, lassen sich die Bakterien nicht direkt analysieren, oder untersuchen, weswegen sie auf Nährmedien gesammelt und bebrütet werden. Man unterscheidet neben flüssigen und festen Nährmedien, zwischen Vollmedien, welche das Wachstum einer Vielzahl von Bakterien erlauben und Selektivmedien, die das Wachstum gewisser Bakterien hemmen oder fördern können. Basismedien geben Auskunft über die Gesamtkeimzahl einer Probe, während Selektivmedien dazu verwendet werden, mögliche Leitkeime zu finden und diese zu isolieren. Nährmedien benötigen neben Wasser und einem pH-Puffer auch eine Energiequelle, eine Kohlenstoffquelle und gewisse Salze, um den Bakterien die nötigen Nährstoffe liefern zu können. (13)

Trypton Soja-Agar (TSA)

Für die Auswertung von Bakterien wird als Basismedium der Trypton Soja Agar verwendet, der aufgrund seiner nährstoffreichen Zusammensetzung das Wachstum einer Vielzahl von Bakterien erlaubt. Auf diesem Medium wachsen sowohl aerobe oder anaerobe, als auch anspruchsvolle, beziehungsweise weniger anspruchsvolle Keime. Es besteht im Wesentlichen aus Caseinpepton und Sojamehlpepton und wurde in der vorliegenden Arbeit für die quantitative Auswertung der Gesamtkeimzahl verwendet (Abbildung 3.1). (30)

Zusammensetzung:

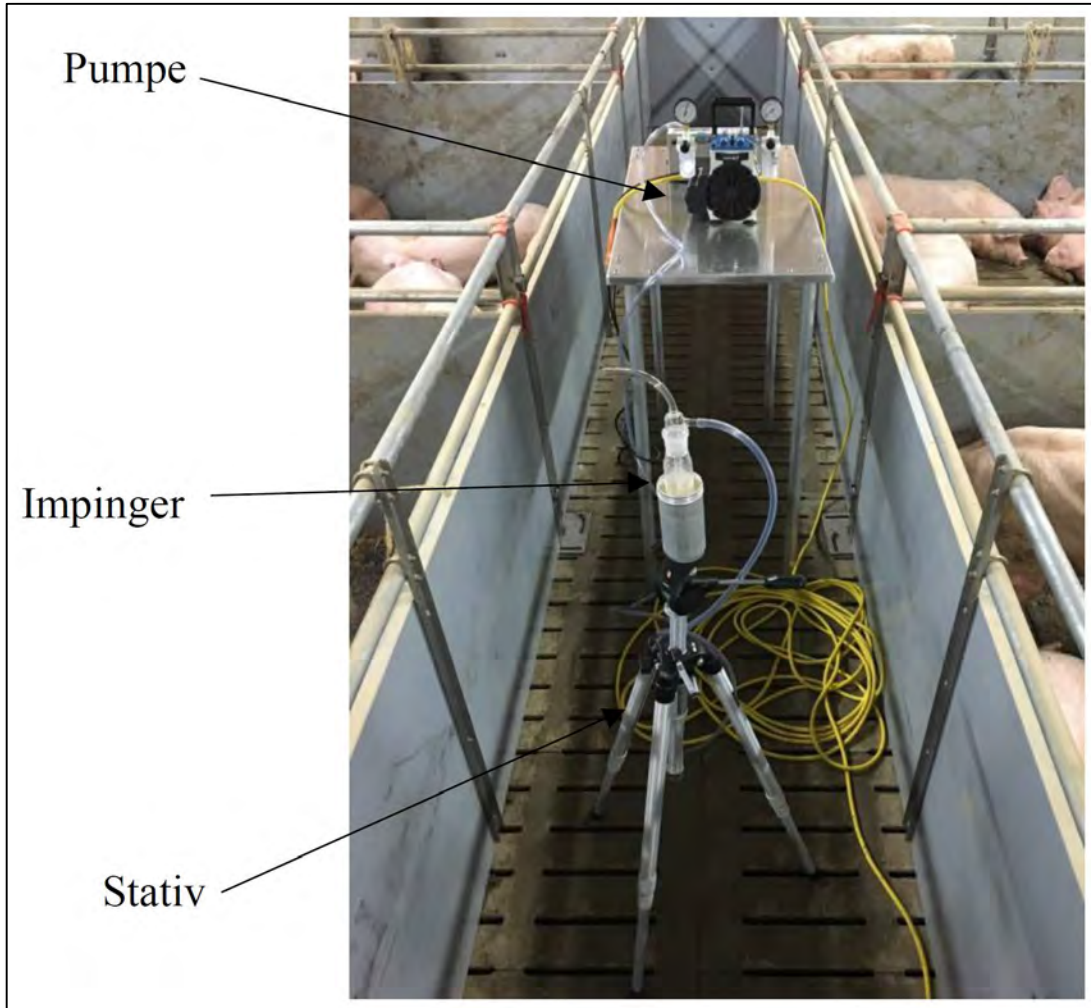
Casein, tryptisch verdaut	15,0 g/l
Sojapepton	5,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Agar	15,0 g/l
pH-Wert	7,2±0,1

Tabelle 3.1: Inhaltsstoffe TSA-Agar (30)



Abbildung 3.1: TSA-Agar bebrütet (CKöck)

I. Sammlung (a)



I. Sammlung (b)



Abbildung 21: Nackenabstrichstelle (©Kedwani)



Abbildung 20: VWR-Transportwap (©Kedwani)



I. Sammlung (c)

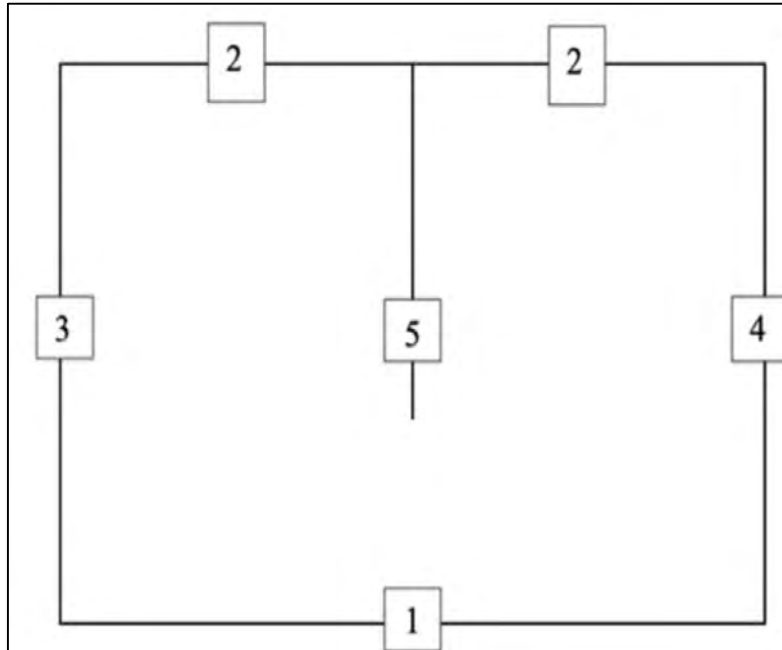


Abbildung 22: schematische Darstellung über die Reihenfolge der Probenahmen 1-5 (©Kedwani)



Abbildung 23: Buchten im Tierstall (©Kedwani)



II. Kultivierung

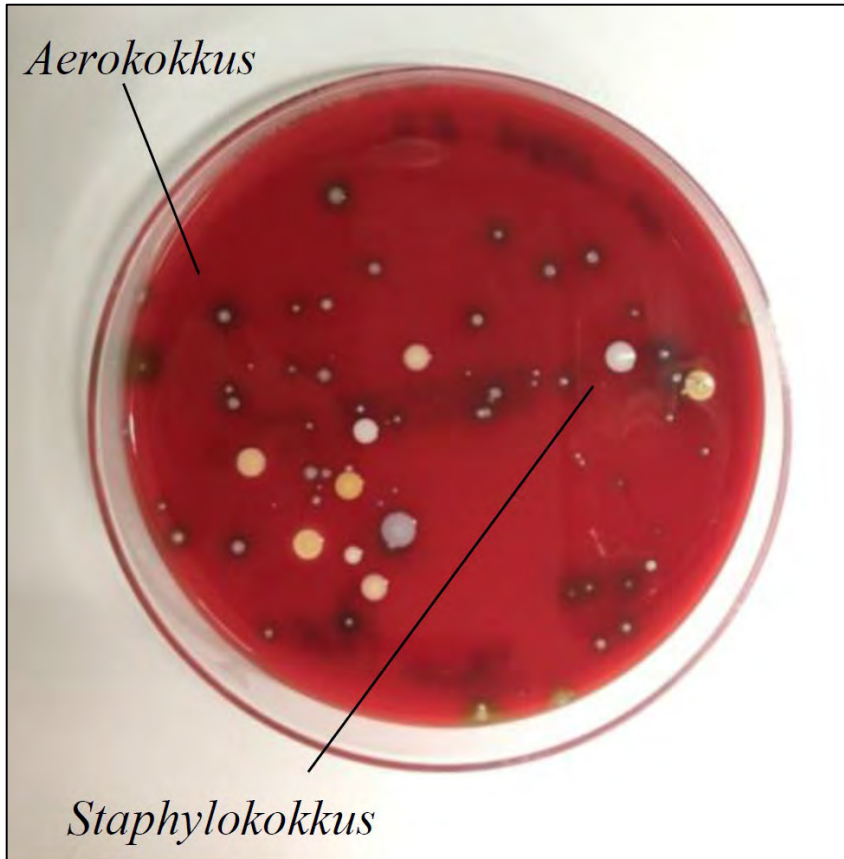
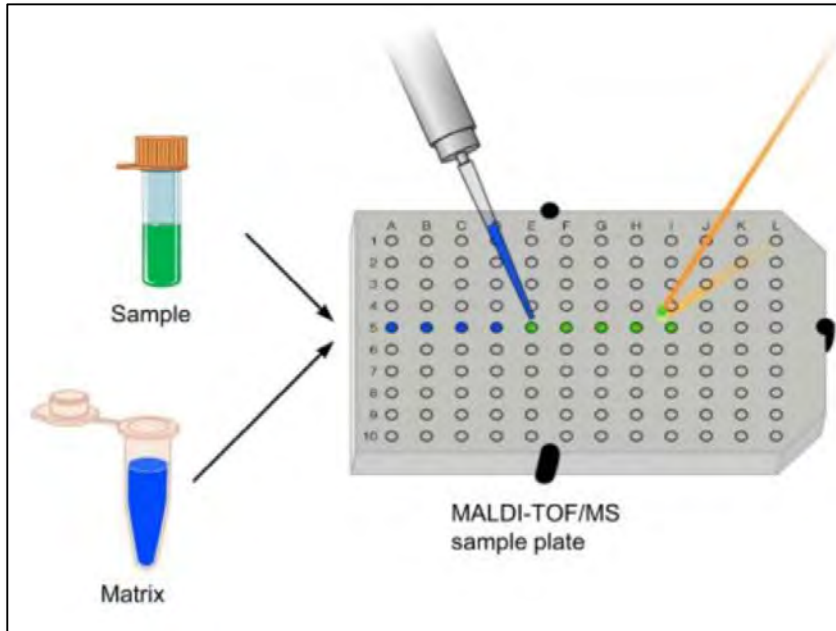


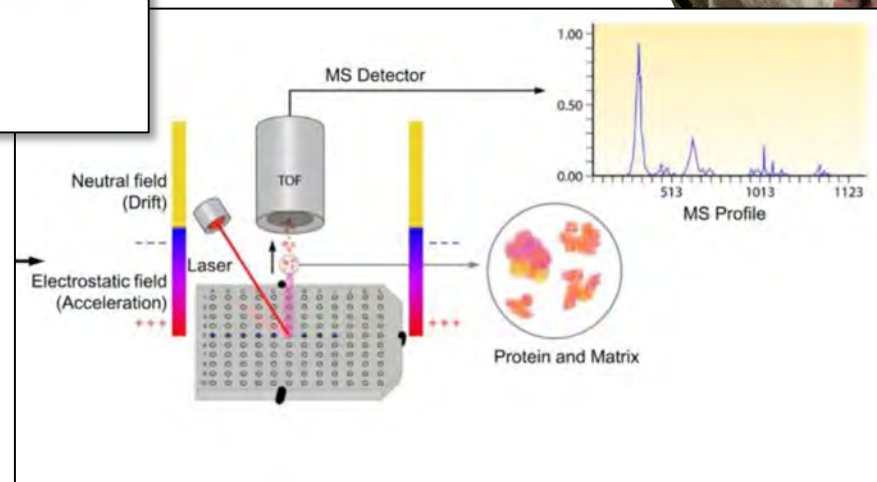
Abbildung 3.2: COL-Agar bebrütet (©Köck)



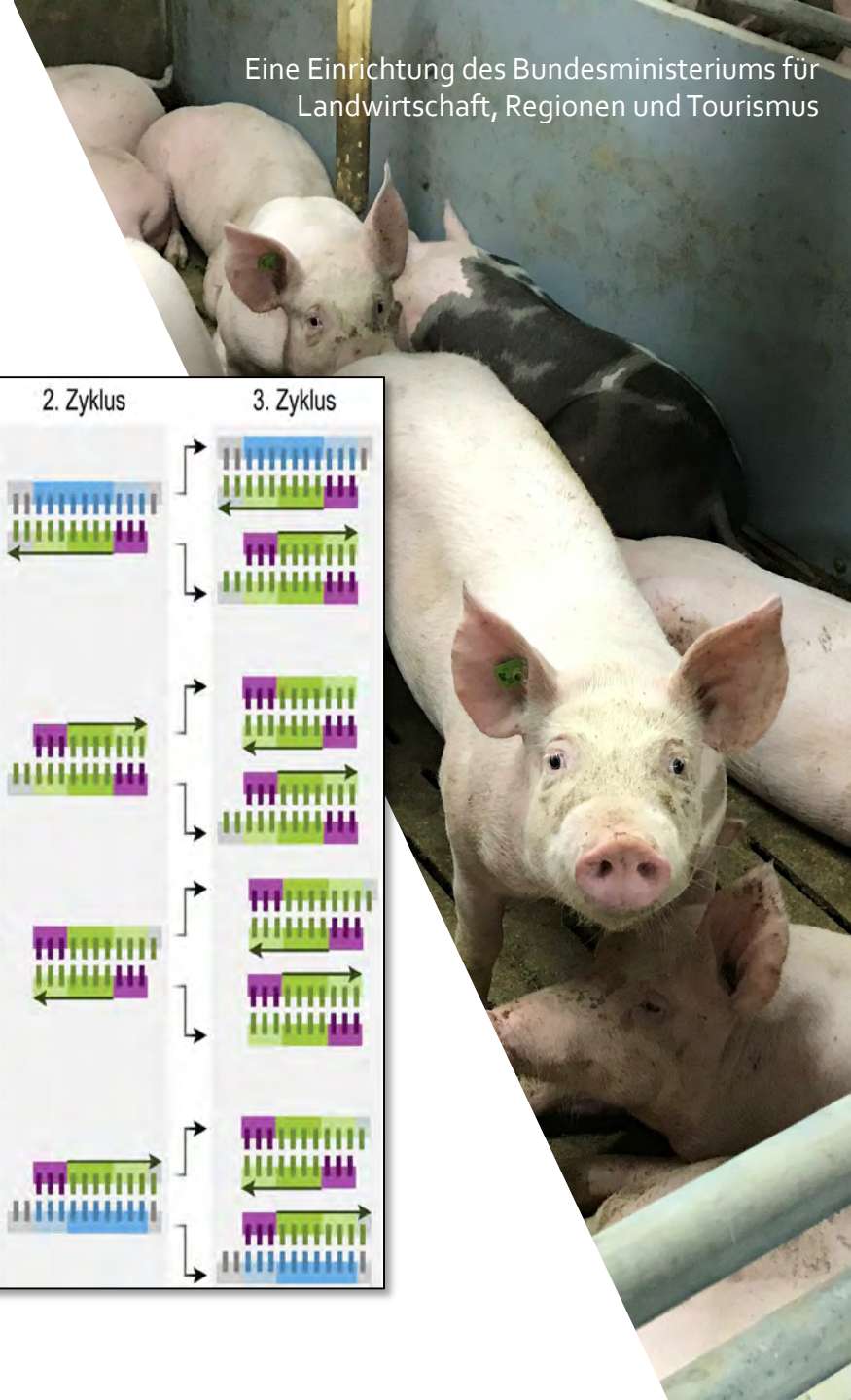
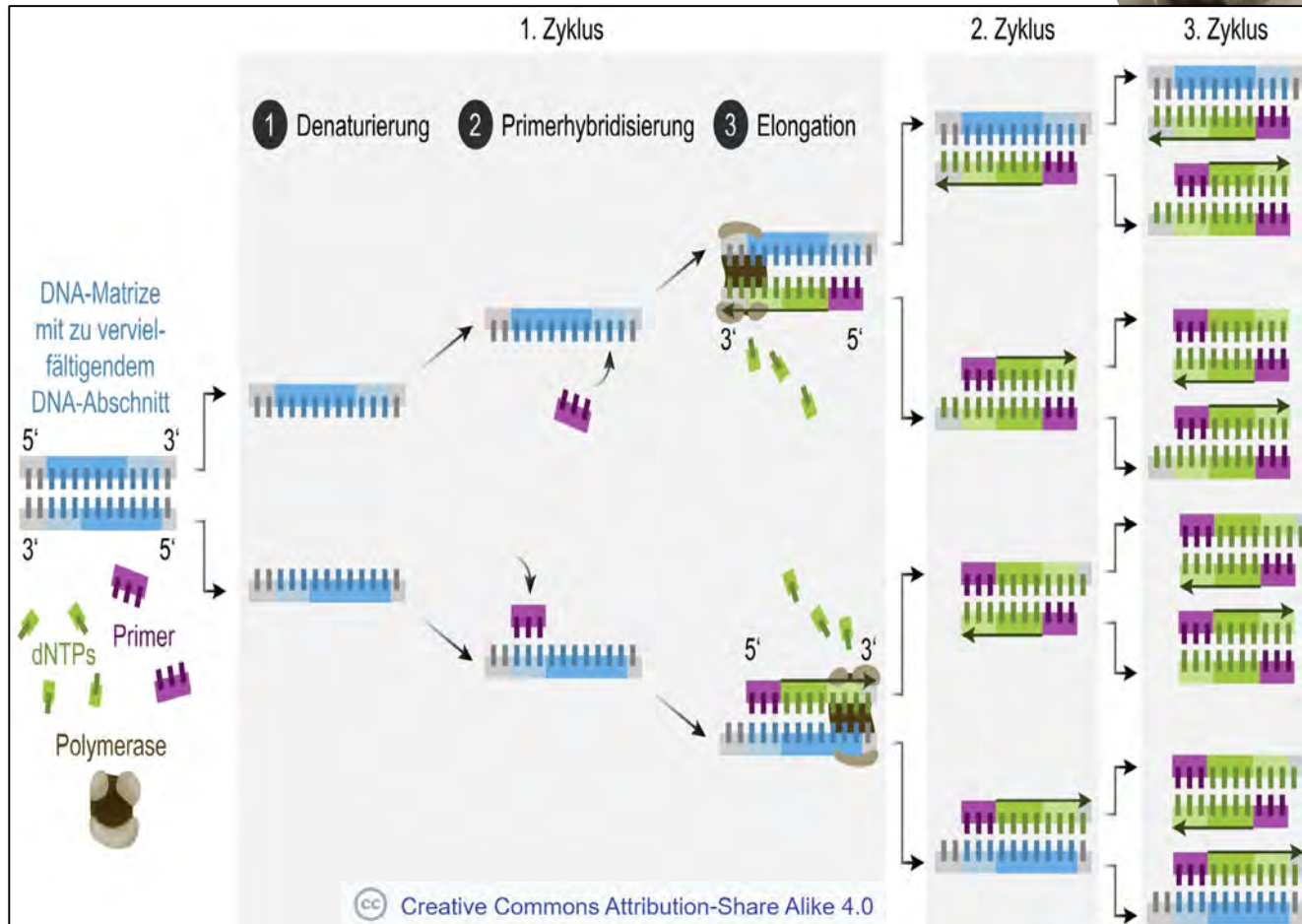
III. Identifizierung



www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm



IV. *spa*-Typisierung



V. Antibiotika-Resistenz

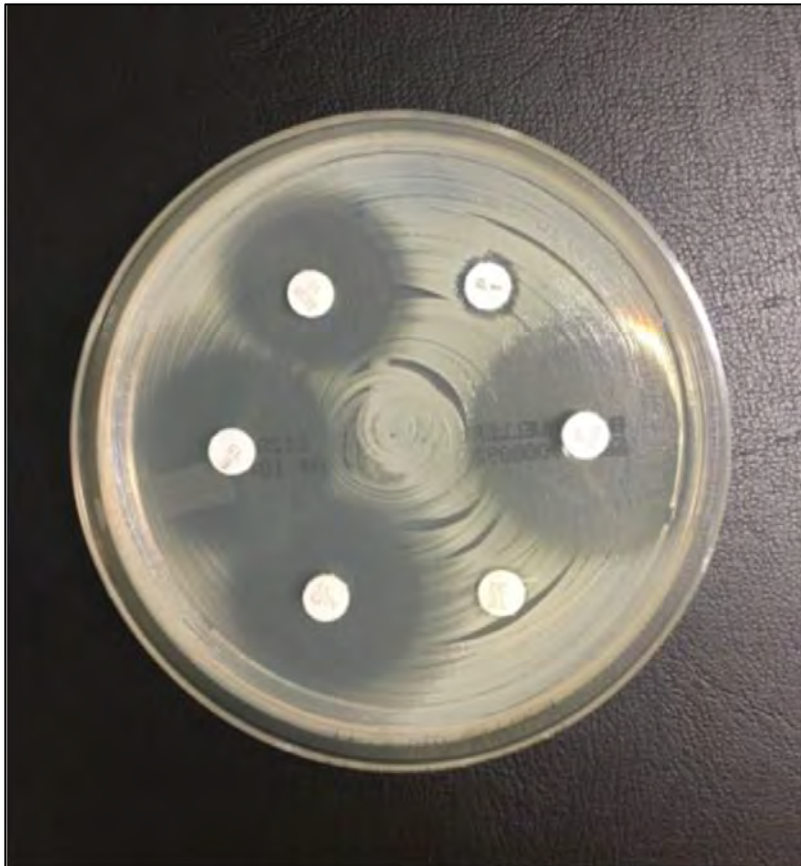


Abbildung 3.12: Müller Hinton-Agar bebrütet
(©Köck)

Verwendete Antibiotika

- Penicillin (P)
- Cefoxitin (FOX)
- Tetracyclin (TE)
- Clindamycin (CC)
- Erythromycin (E)
- Norfloxacin (NOR)
- Mupirocin (GM)
- Linezolid (LZD)
- Rifampicin (RA)
- Fusidinsäure (FA)
- Sulfamethoxazol und Trimetoprim (SXD)
- Gentamicin (GM)

aus Diplomarbeit S. Köck, Seiten 44/45

S. Köck: Untersuchungsumfang

- November 2018 – März 2019
- 10 Erhebungen in 2 Mastperioden
- Beprobung
 - je 3 Tiere (136 Tiere/Abteil)
in 2018 & 2019
 - Luftkeimmessungen
 - 1. Orientierungsarbeit



S. Köck: Ergebnis - Luft

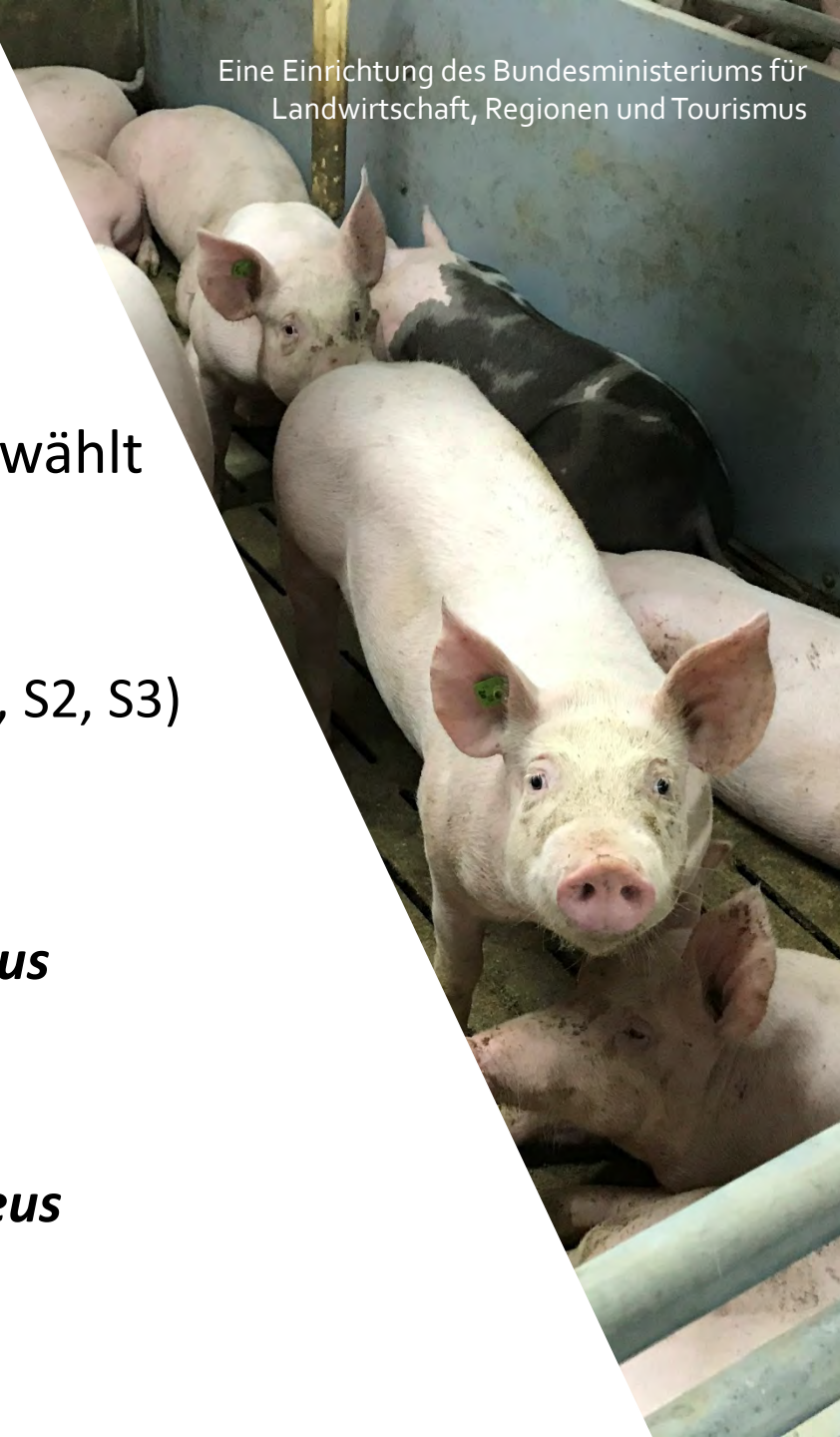
Bakteriengattungen und -arten	1. Messserie	2. Messserie
<i>Staphylococcus</i>		
<i>Staphylococcus arlettae</i>	1	1
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	-
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2	-
<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	12	11
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	3
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1	-
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	30	15
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4	3
<i>Staphylococcus warneri</i>	4	3
<i>Streptococcus</i>		
<i>Streptococcus mitis</i> / <i>Streptococcus oralis</i>	4	-
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1	-
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	1	-
<i>Streptococcus vestibularis</i>	1	-
<i>Aerococcus</i>		
<i>Aerococcus viridans</i>	30	19

kein MRSA



S. Köck: Ergebnis - Tiere

- 6 Tiere (aus 2 Messserien) ausgewählt
- *S. aureus* bei
 - 1 Tier aus 1. Messserie (S4)
 - 3 Tieren aus 2. Messserie (S1, S2, S3)
- Schweine 2, 3, 4
 - MSSA
 - **Methicillin sensitiver *S. aureus***
- Schwein 1
 - MRSA
 - **Methicilin resistenter *S. aureus***



S. Köck: Ergebnis - Antibiogramm

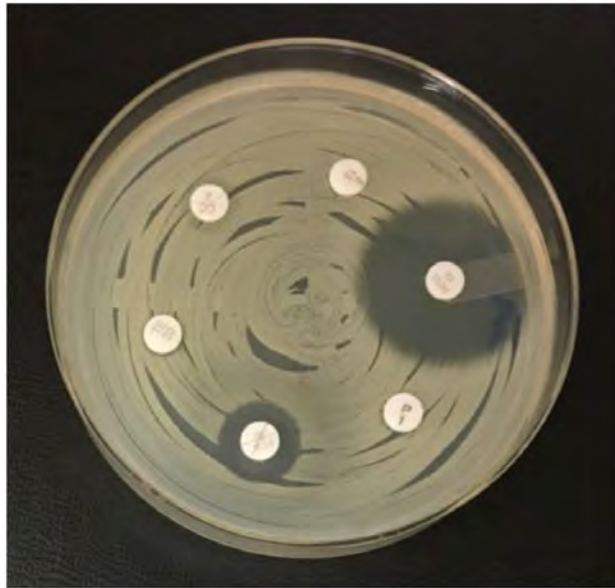


Abbildung 4.9: Antibiogramm MRSA (©Köck)

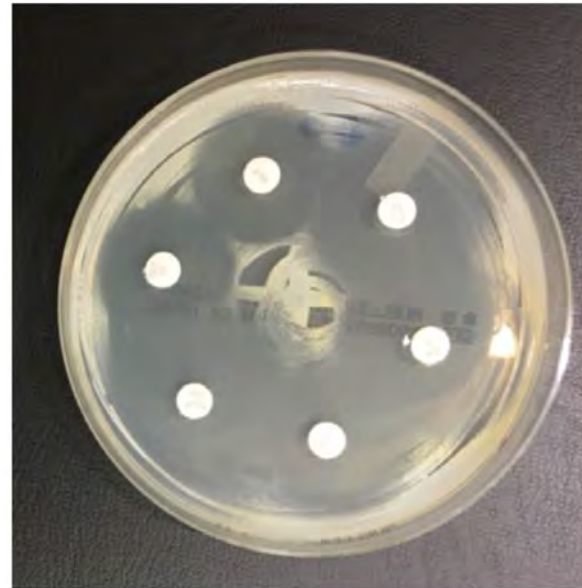


Abbildung 4.10: Antibiogramm Reserveantibiotika MRSA (©Köck)

- Antibiogramm MRSA / Schwein 1
- zahlreiche Resistenzen, aber
- empfindlich auf „Reserveantibiotika“

J. Kedwani: Untersuchungsumfang

- März – Juni 2020
- 4 Erhebungen in Mastperiode
- vor Einstellung & in
- Mastwoche 2, 12, 14
- Beprobung
 - Wände von 1 von 6 Buchten und Gang
 - 30 Tiere (selbe 5 je Bucht, 136 Tiere je Abteil)
 - Luftkeimmessungen
- coronabedingt waren Erhebungen über gesamte Mastdauer nicht möglich



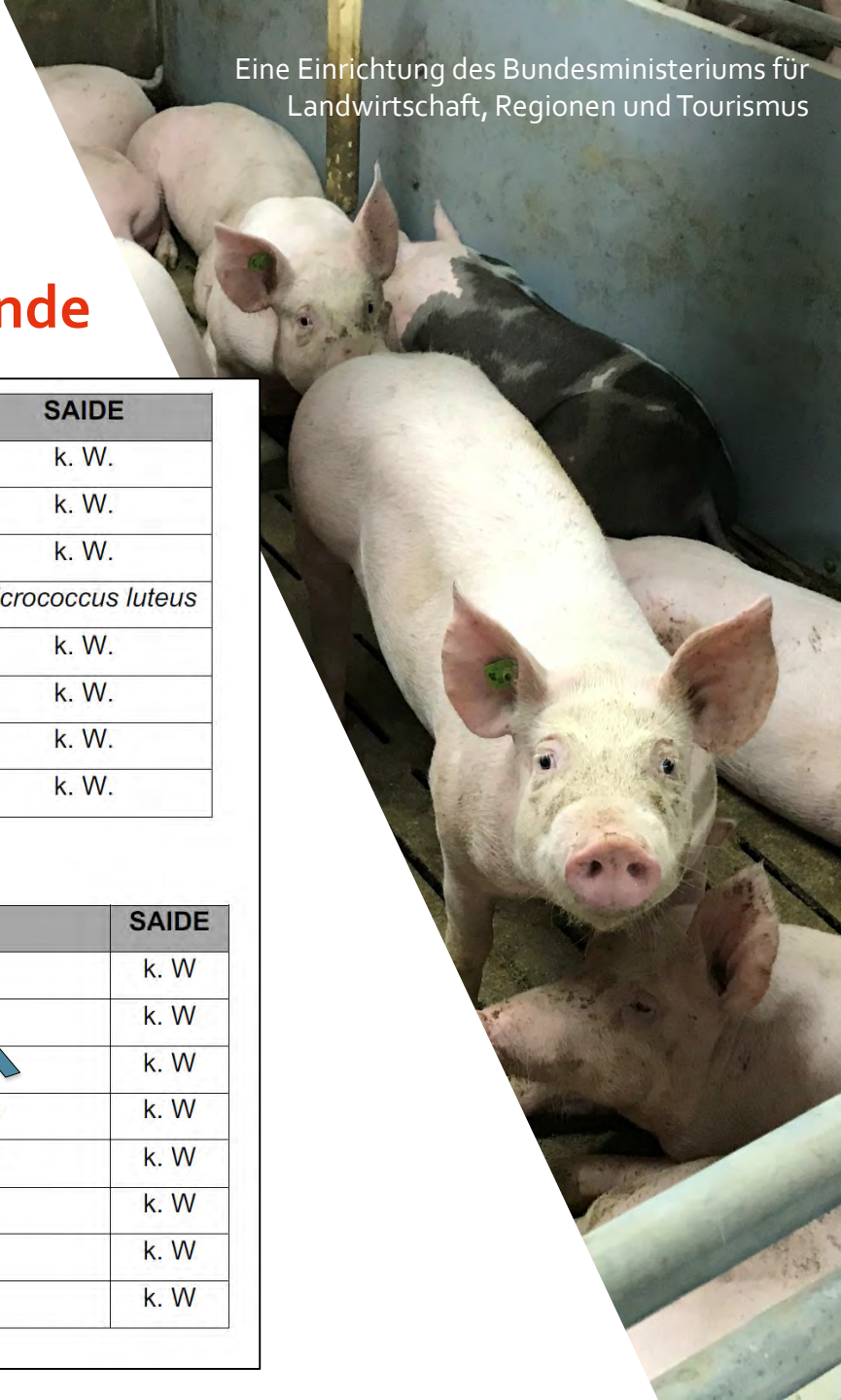
J. Kedwani: Ergebnis - Buchtenwände

Nährmedien		MRSA	MAN	CNA	SAIDE
Bucht 1	Probe 1	k. W.	<i>S. equorum</i>	k. W.	k. W.
	Probe 2	k. W.	k. W.	k. W.	k. W.
	Probe 3	k. W.	k. W.	<i>Enterococcus faecium</i>	k. W.
	Probe 4	k. W.	<i>S. equorum</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
	Probe 5	k. W.	k. W.	<i>Micrococcus luteus</i>	k. W.
Gang	Probe 6	k. W.	k. W.	k. W.	k. W.
	Probe 7	k. W.	k. W.	k. W.	k. W.
	Probe 8	k. W.	k. W.	k. W.	k. W.

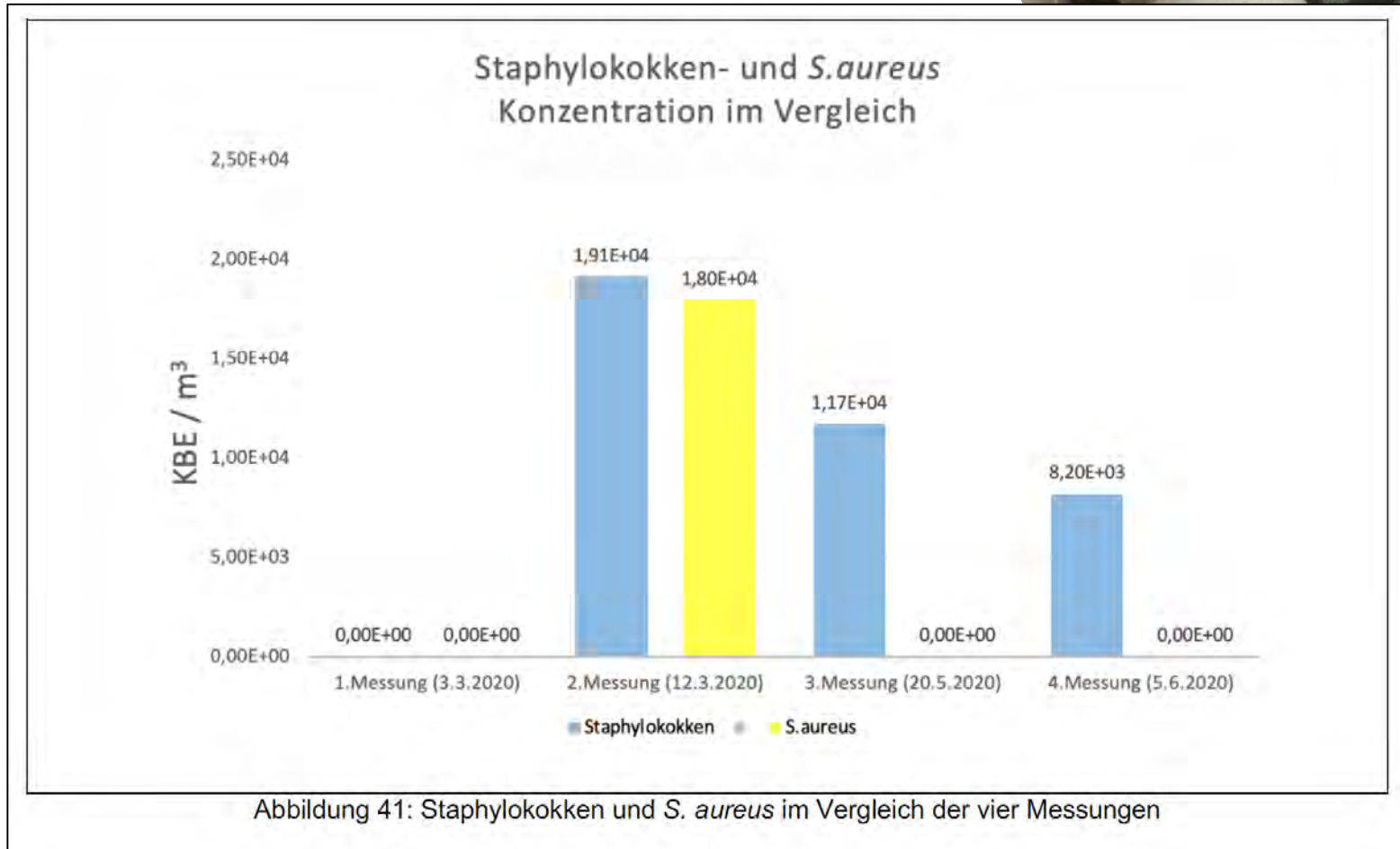
Tabelle 30: Wandabstriche vor Einstallung

Nährmedien		MRSA	MAN	CNA	SAIDE
Bucht 1	Probe 1	k. W.	k. W.	<i>Bacillus subtilis</i>	k. W.
	Probe 2	k. W.	k. W.	<i>Bacillus subtilis</i>	k. W.
	Probe 3	k. W.	k. W.	<i>Staphylococcus sciuri</i>	k. W.
	Probe 4	k. W.	k. W.	<i>Staphylococcus similans</i>	k. W.
	Probe 5	k. W.	k. W.	<i>Staphylococcus pasturi</i>	k. W.
Gang	Probe 6	k. W.	k. W.	<i>Bacillus subtilis</i>	k. W.
	Probe 7	k. W.	k. W.	<i>Bacillus subtilis</i>	k. W.
	Probe 8	k. W.	k. W.	<i>Bacillus subtilis</i>	k. W.

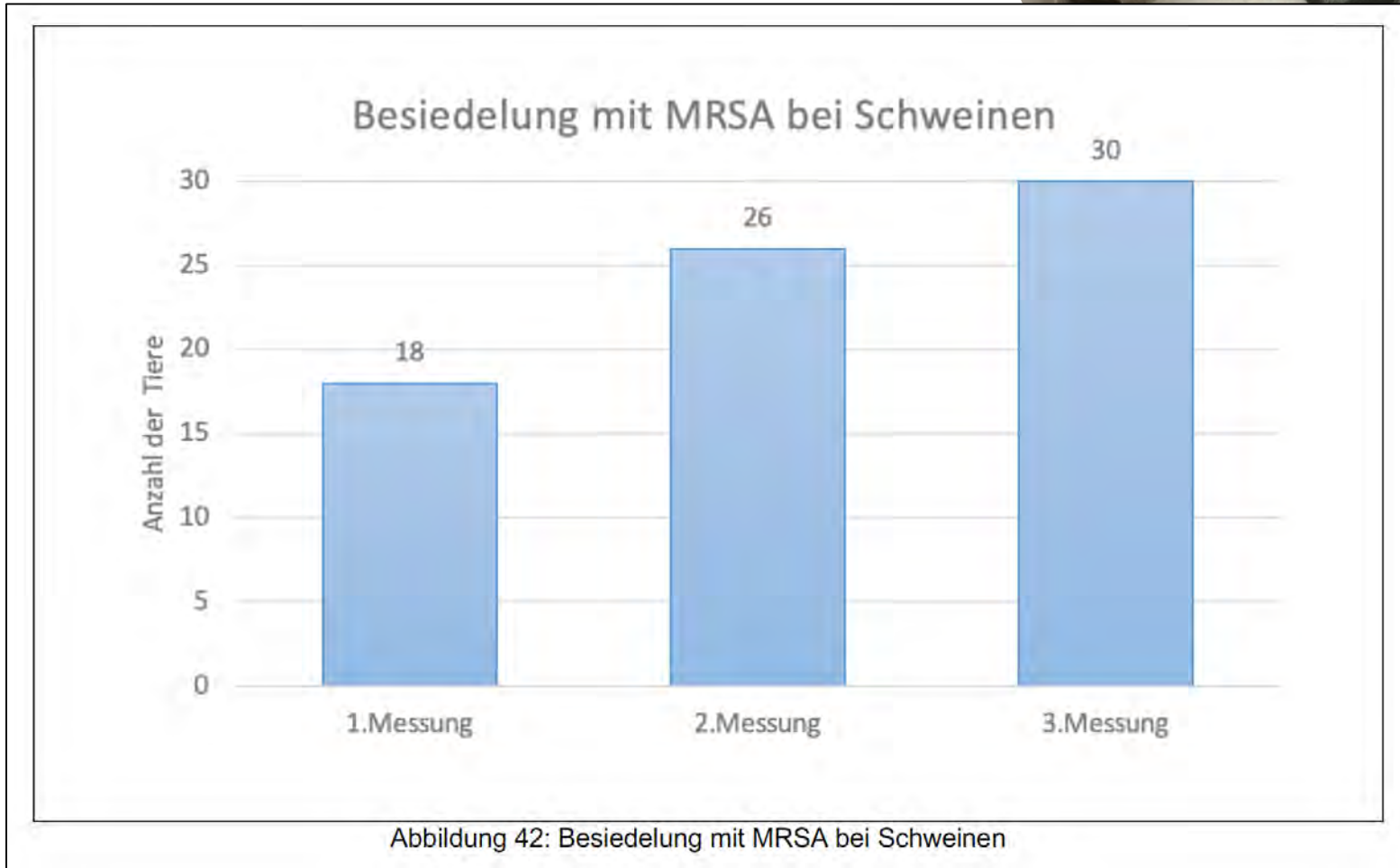
Tabelle 31: Wandabstriche nach Ausstallung



J. Kedwani: Ergebnis - Luft



J. Kedwani: Ergebnis - Tiere



J. Kedwani: Ergebnis - Antibiotogramm

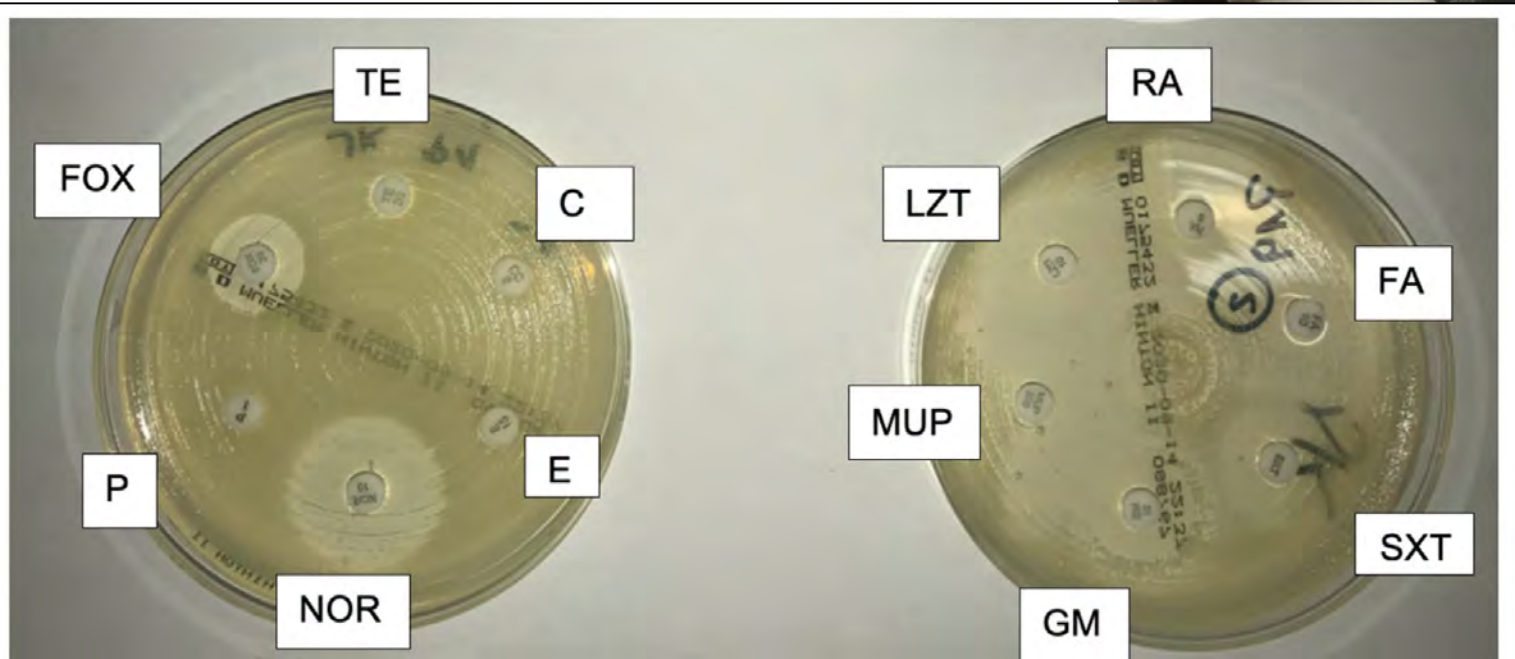


Abbildung 44: Antibiotogramm der getesteten Stämme (©Kedwani)

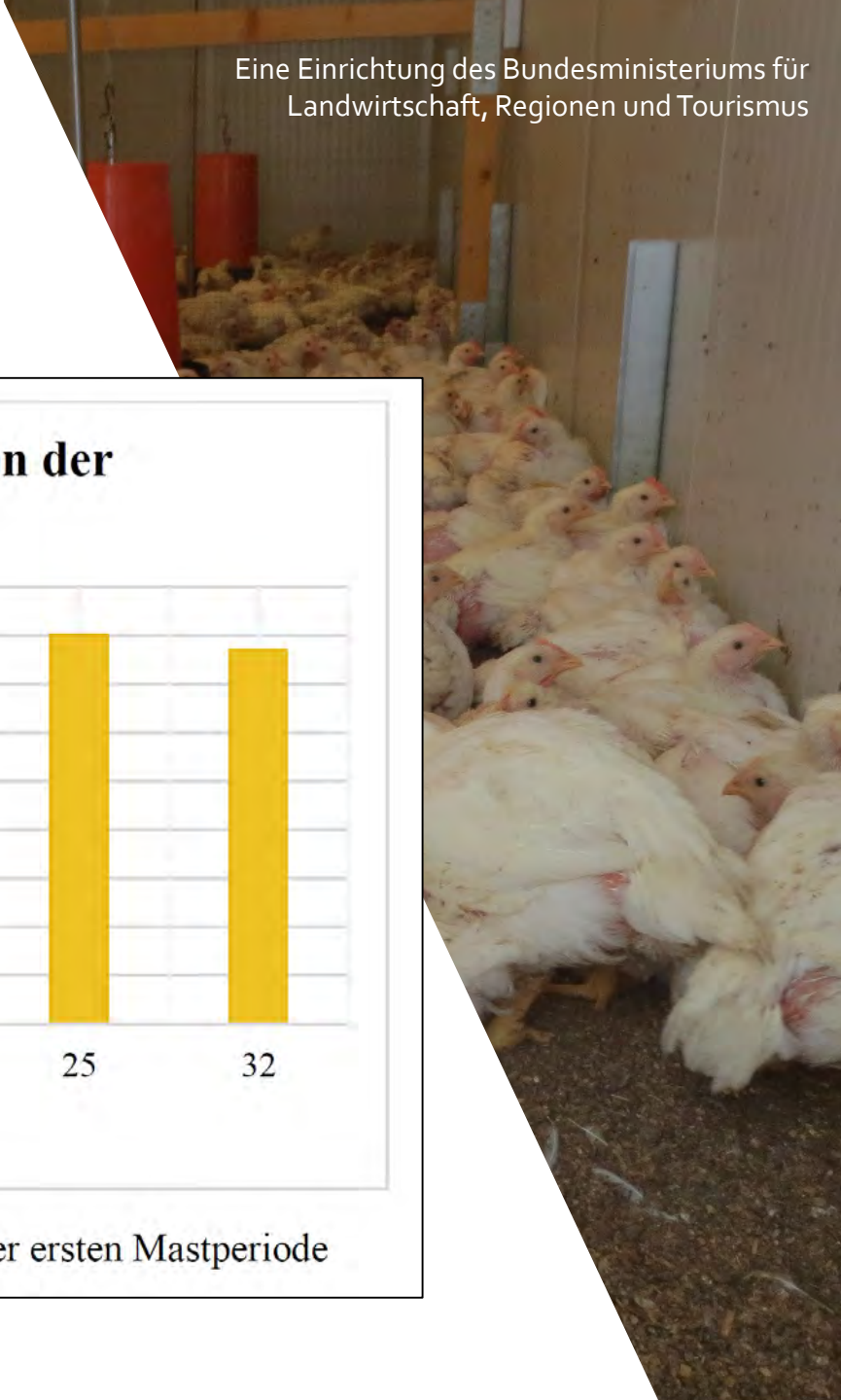
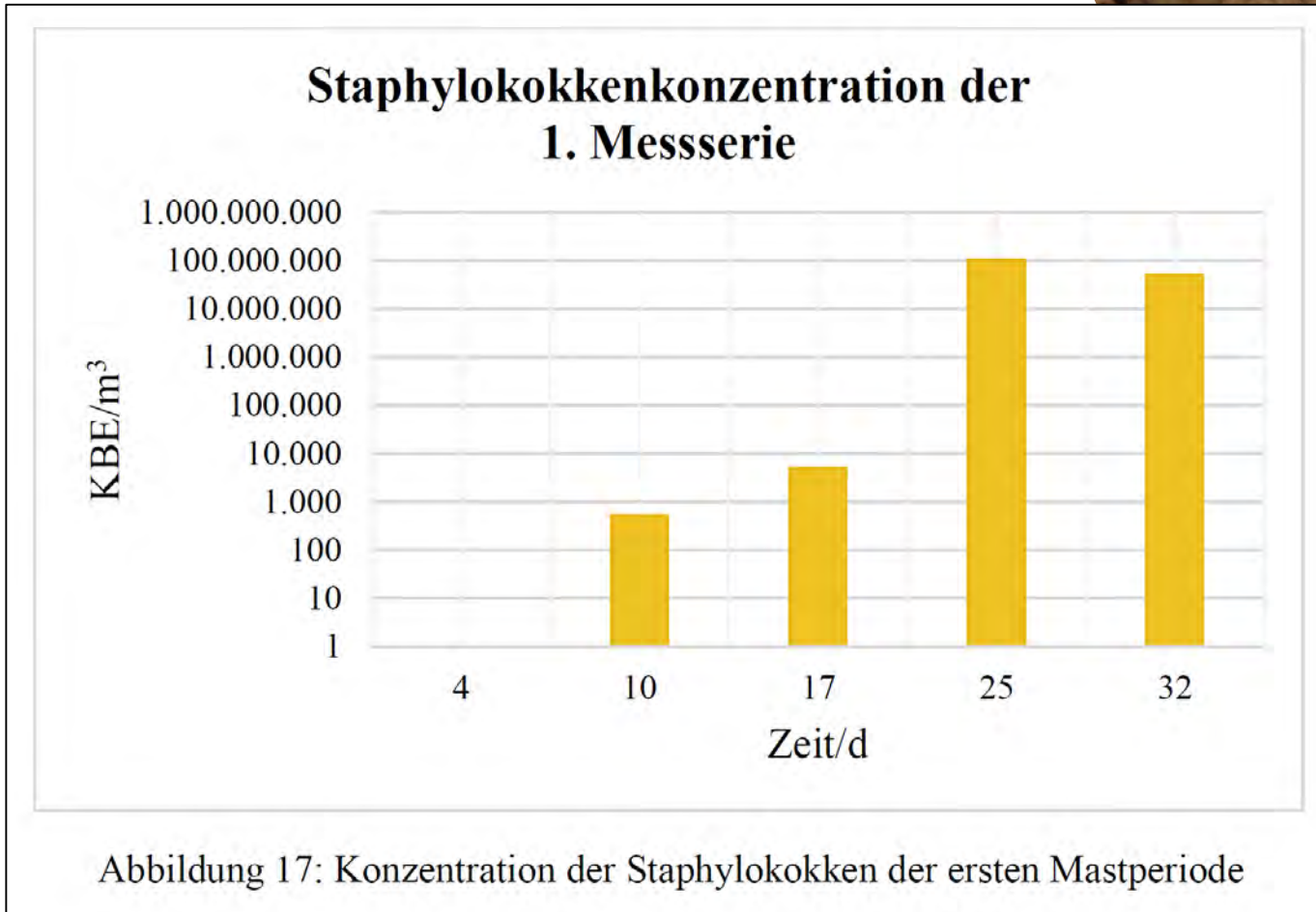
- 1 MRSA aus der Luft, 30 MRSA von Tieren
- 5 exemplarisch *spa*-typisiert: **LA-MRSA**

T. Mišković: Untersuchungsumfang

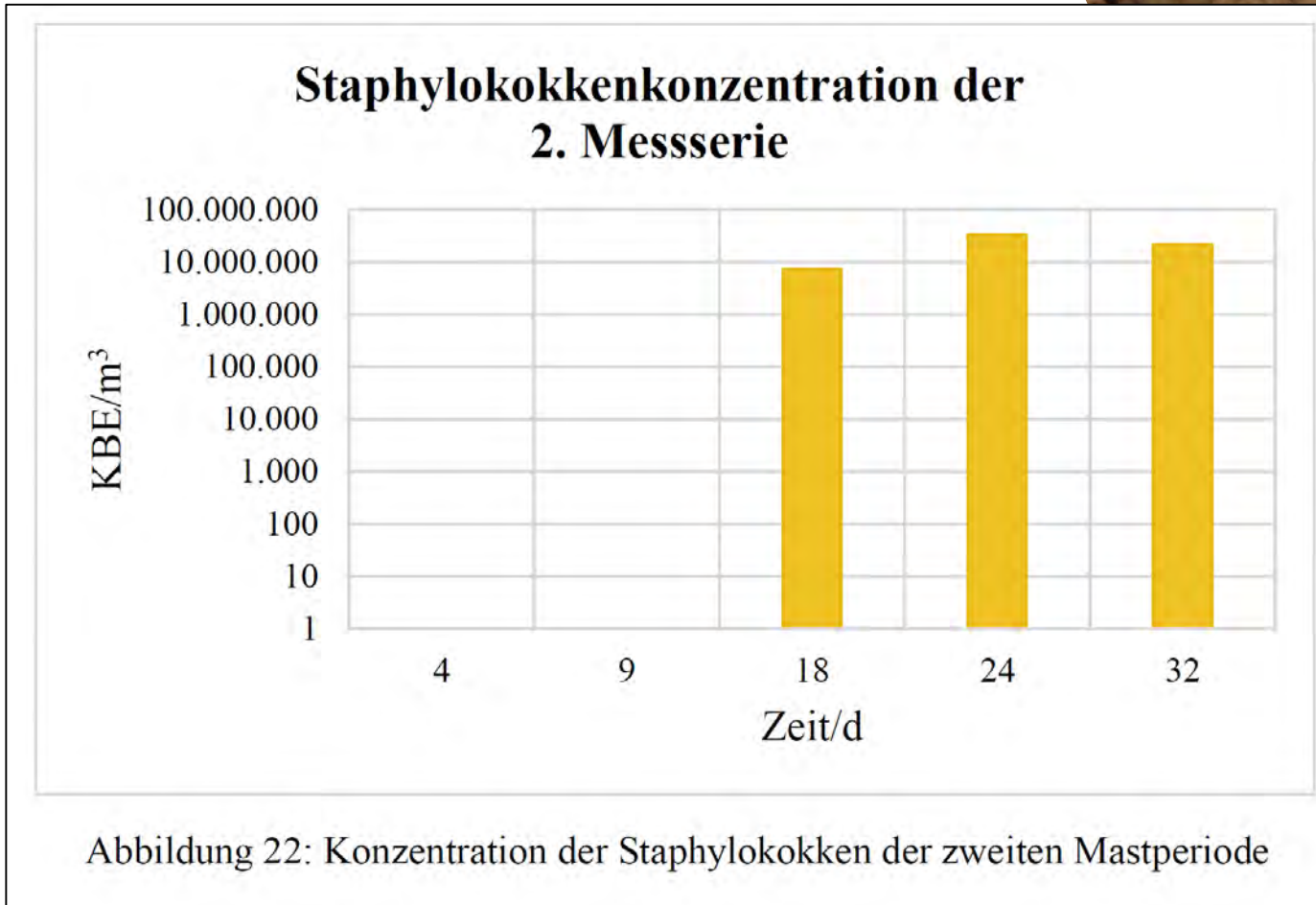
- Nov/Dez 2018 & Feb/März 2019
- 10 Erhebungen in 2 Mastperioden
- wöchentlich während Mastverlauf
- Beprobung
 - Luftkeimmessungen (420 Tiere im Abteil)
 - 1. Orientierungsarbeit



T. Mišković: Ergebnis Luft (a)



T. Mišković: Ergebnis Luft (b)



T. Mišković: Ergebnis Luft (c)

Tabelle 8: Identifizierte Bakteriengattungen und deren Häufigkeit in beiden Messserien

Bakteriengattungen und -arten (n=162)	1. Messserie	2. Messserie
<i>Staphylococcus</i>		
<i>S. arlettae</i>	2	5
<i>S. aureus</i>	1	-
<i>S. capitis</i>	-	1
<i>S. lugdunensis</i>	1	-
<i>S. saprophyticus</i>	9	13
<i>S. sciuri</i>	-	3
<i>S. warneri</i>	-	1
<i>S. xylosus</i>	20	3
<i>Enterococcus</i>		
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	5	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	-
<i>Enterococcus faecium</i>	12	1
<i>Enterococcus gallinarum</i>	-	1
<i>Enterococcus hirae</i>	21	13
<i>Aerococcus</i>		
<i>Aerococcus viridans</i>	2	5
(Lacto-)Bacillus		
<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	3	-
<i>Bacillus megaterium</i>	3	-
<i>Lactobacillus salivarius</i>	2	-

Anmerkung: Auszug aus Tabelle 8



T. Mišković: Ergebnis Antibiogramm

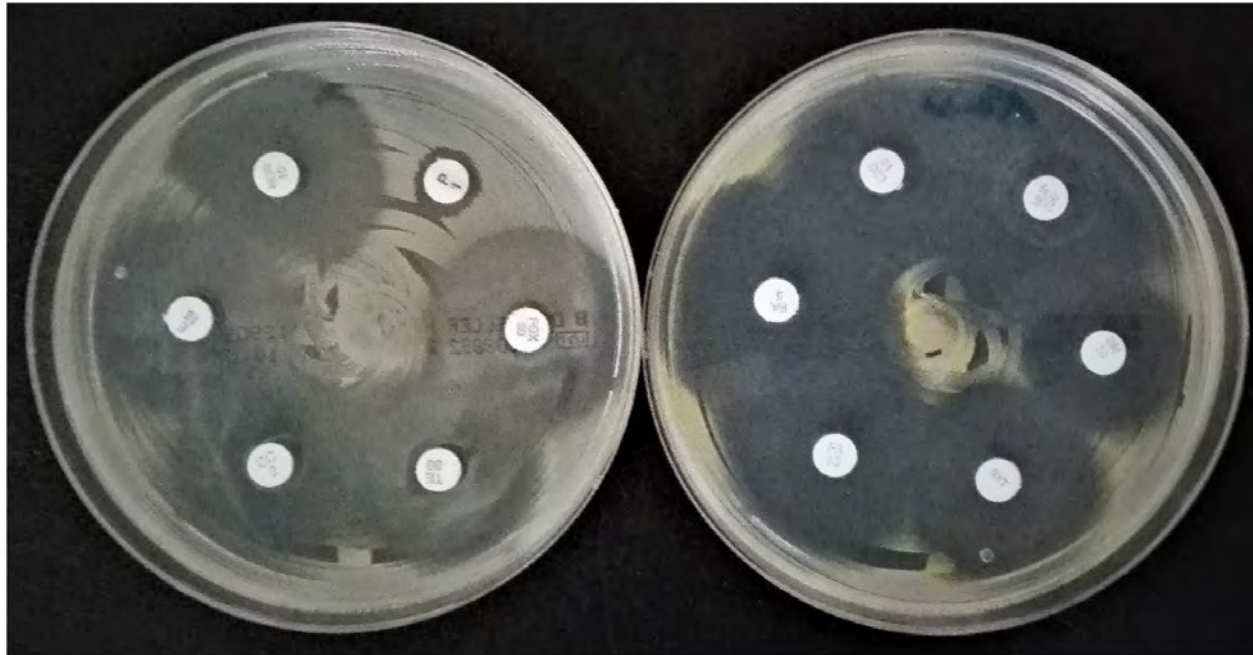


Abbildung 26: Antibiogramm der untersuchten *S. aureus*-Kolonie (Quelle: eigen)

- MSSA – Methicilin sensibler *S. aureus*
- als humamer MSSA identifiziert (*spa*-Typing)

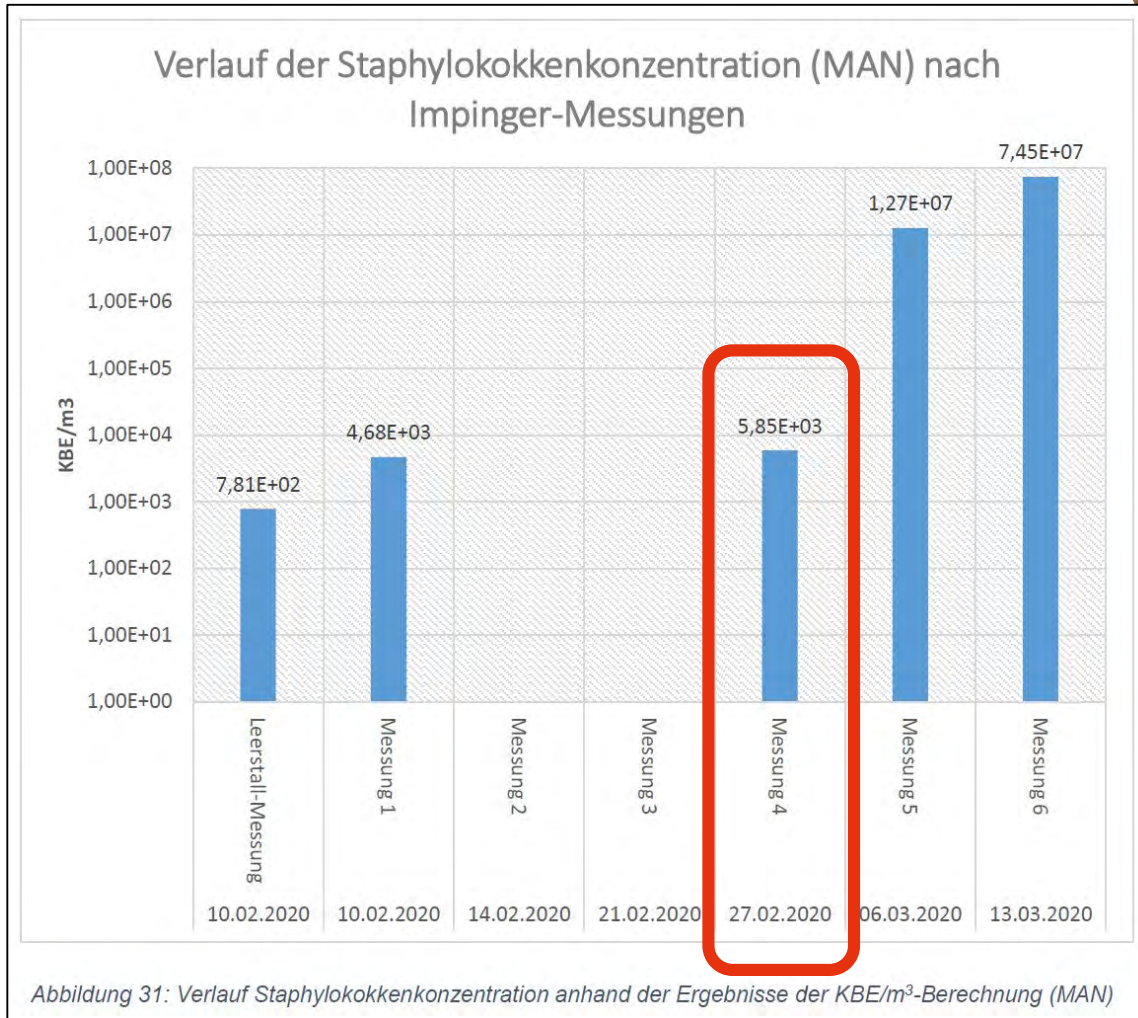


T. Eirisch: Untersuchungsumfang

- Februar - März 2020
- 6 Erhebungen während 1 Mastperiode
- vor Einstallung der Tiere &
- wöchentlich während Mastverlauf
- Beprobung
 - Luftkeimmessungen (420 Tiere im Abteil)
 - Nackenabstriche (20 Tieren/Erhebungstag)
- weitere 6 Erhebungen fielen coronabedingt aus



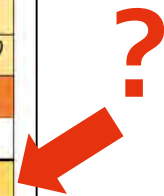
T. Eirisch: Ergebnis – Luft (a)



T. Eirisch: Ergebnis – Luft (b)

Nährmedium	identifizierte Isolate	Ergebnis
MAN	6 von 6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
MAN	8 von 8	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 0
MAN	1 von 1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
MAN		kein Wachstum
CNA	6 von 35	<i>Staphylococcus aureus</i>
CNA	4 von 14	<i>Staphylococcus hominis</i>
CNA	1 von 2	<i>Staphylococcus hominis</i>
CNA	1 von 1	<i>Micrococcus luteus</i>
CNA		kein Wachstum
CNA		kein Wachstum
SL	29 von 29	intestinale Enterokokken (GAA)
SL	23 von 23	intestinale Enterokokken (GAA)
SL	4 von 4	intestinale Enterokokken (GAA)
SL	3 von 3	intestinale Enterokokken (GAA)
SL		kein Wachstum
SL		kein Wachstum
MC		kein Wachstum
MC		kein Wachstum
SAIDE		kein Wachstum
SAIDE		kein Wachstum
MRSA		kein Wachstum
MRSA		kein Wachstum

Tabelle 21: Qualitative Ergebnisse: Impinger-Messung 4 vom 27.02.2020



T. Eirisch: Ergebnis - Tiere

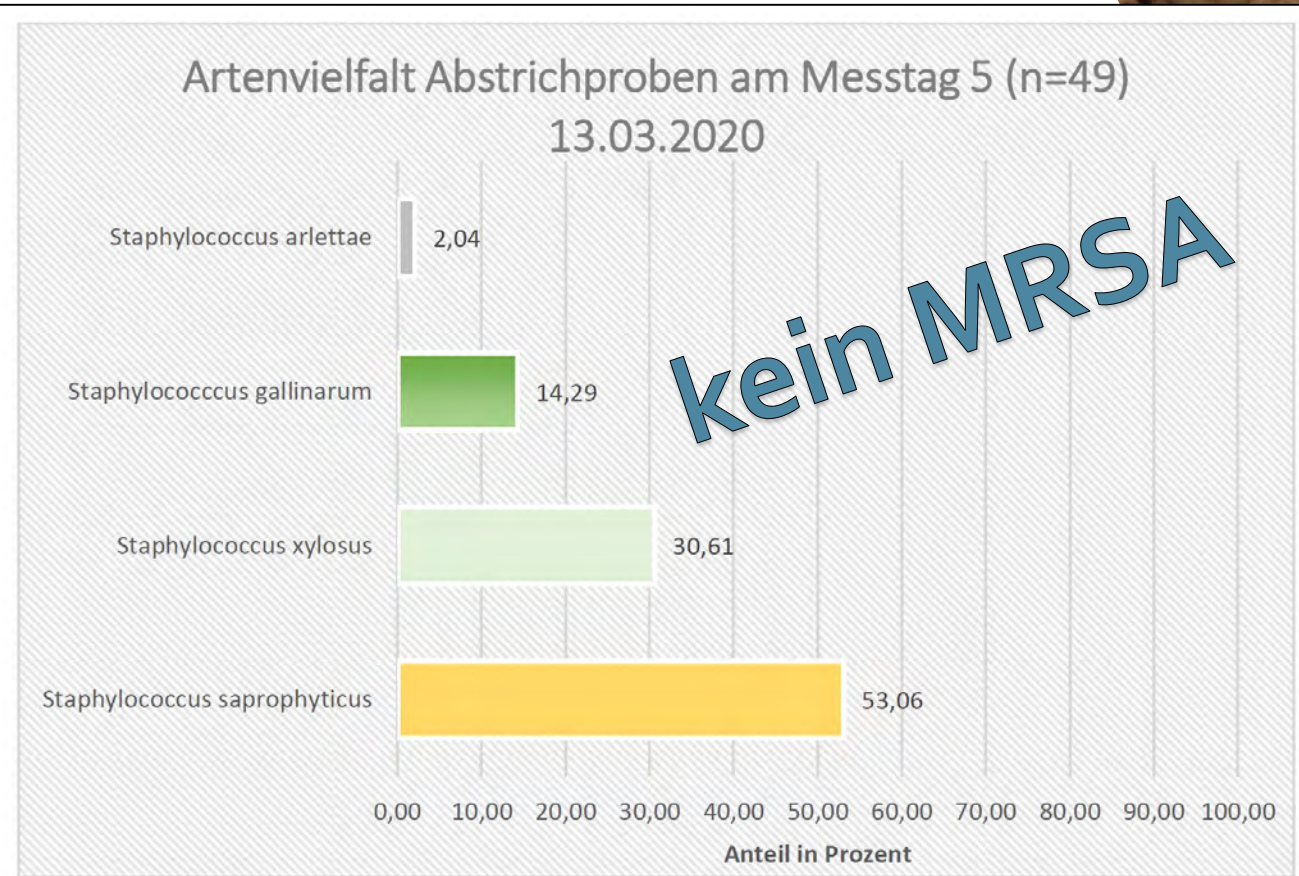


Abbildung 40: Prozentuelle Artenvielfalt Abstrichproben am Messtag 5 vom 13.03.2020



T. Eirisch: Ergebnis - Antibiogramm

Probe		P	FOX	TE	CC	E	NOR	MUP	LZD	RA	FA	SXT	GM
<i>S.aureus</i>	S>	26	22	22	22	21	17	30	21	26	24	17	18
	R<	26	22	19	19	18	17	18	21	23	24	14	18
1A		9	26	26	26	28	28	38	30	30	30	32	22
1B		9	26	26	24	24	26	40	24	30	28	26	20

Tabelle 24: Antibiogramm und Grenzwerte nach EUCAST v10 [23]

- *S. aureus* aus Luftkeimsammlung
- nur gegen Penicillin (P) resistent
- Cefoxitin (FOX) stellvertretend für Methicillin
- *S. aureus* auf Cefoxitin sensibel
- MSSA liegt vor: Methicillin sensibler Keim

Fazit - Schweine

- Untersuchungsumfang:
 - 14 Luftkeimsammlungen
 - 16 Wandabstriche
(vor Ein- & nach Ausstallung)
 - Abstriche von 36 Tieren, zT mehrmalig
(Nasenhöhlen & Nacken)
- Ergebnisse:
 - 1 LA-MRSA in Luftkeimsammlung
 - 0 LA-MRSA bei Wandabstrichen
 - 31 Tiere LA-MRSA Träger



Fazit - Geflügel

- Untersuchungsumfang:
 - 17 Luftkeimsammlungen
 - 6x Abstrichnahme bei je 20 Tieren
- Ergebnisse:
 - 0 LA-MRSA in Luftkeimsammlung
 - 0 Tiere LA-MRSA Träger



Zusammenfassung

- kein Untersuchungsergebnis ist absolut
- Resultat in mehreren Untersuchungen bestätigt: untermauert die Evidenz
- Diplomarbeiten Luquasta HBLFA:
 - bei **Mastgeflügel kein Hinweis** auf **LA-MRSA** (weder Luft noch Tiere)
 - bei **Mastschweinen selten LA-MRSA**
Nachweis **in der Luft** (1 von 14 Proben),
jedoch **Tiere häufig Träger** von **LA-MRSA**
- Hauptübertragungsweg = **Kontaktinfektion**
- Tierkontakt: 138fache Risiko, als Umfeld (RKI, 2016)

