

Claudia Jäckel, Konstanze Behrmann, Eckhard Strauch, Cornelia Göllner, Jonas Nekat, Nicole vom Ort und Jens A. Hammerl



Untersuchungen zur antimikrobiellen Resistenz von *Vibrio parahaemolyticus* Isolaten aus importierten Meeresfrüchten



Dr. Jens A. Hammerl

Konsiliarlabor für *Vibrio* spp. in Lebensmitteln (Abteilung 4, Fachgruppe 45)

Bundesinstitut für Risikobewertung

Berlin (Deutschland)

Lassen Sie uns eine kurze Reise in die Welt der Vibrionen starten...



Bedeutende *Vibrionaceae* (z.B. *Vibrio* spp.)

Wesentliche Charakteristika der Gattung

Gram-negative γ -Proteobakterien

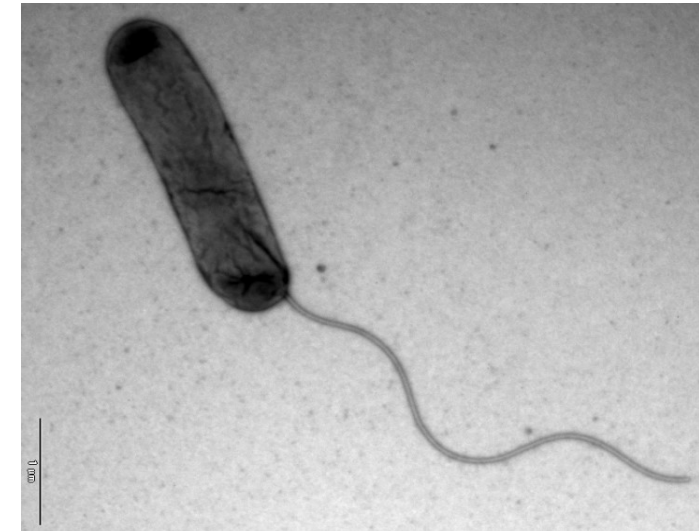
fakultativ anaerob

hauptsächlich halophil

gerade bzw. leicht gekrümmte Stäbchen

polar begeißelt

ubiquitär vorkommend in aquatischen Umwelten ($>15^{\circ}\text{C}$)



Bedeutende Spezies (10 mit human-pathogenem Potenzial, insg. >135 Spezies)

- hohe Bedeutung -

Vibrio cholerae

O1/O139 (Cholera)

non-O1/O139 (Cholera-ähnlich)

Vibrio parahaemolyticus

Vibrio vulnificus

Vibrio alginolyticus

- geringe Bedeutung -

Vibrio fluvialis (Durchfall)

Vibrio furnissii (Durchfall)

Vibrio harveyi (Wundinfektionen)

Vibrio mimicus (Durchfall)

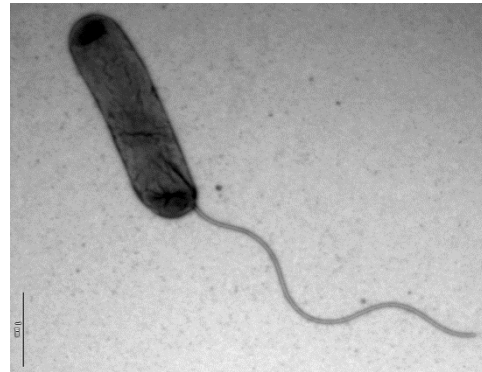
Vibrio metschnikovii (Durchfall, Wundinfektionen)

Vibrio cincinnatiensis (Hautinfektionen, Durchfall)

Übliche Reservoirs für *Vibrio* spp. und deren Bedeutung...

bes. immunsupprimierte Menschen

Vibrionen sind
Umweltbakterien!



direkter Kontakt/
Aufnahme

Wasser,
Sedimente,
Phyto-/Zooplankton...

Fisch (roh/nicht ausreichend erhitzt),
Meeresfrüchte (roh/nicht ausreichend erhitzt),
...Fisch/Meeresfrüchte-konsumierende Tiere

Vibrio Spezies mit einer hohen Bedeutung für den Verbraucherschutz

Vibrio spp.	Reservoir	Intestinale Erkrankung	Bedeutung	Extraintestinal Erkrankung	Bedeutung
V. cholerae					
non-O1/O139	Wasser, Lebensmittel	Gastroenteritis	Hoch	Wundinfektion, Otitis	Mittel
O1/O139	Wasser, Lebensmittel (Reise-assoziierte Erkrankung)	Cholera	(Sehr hoch)	Wundinfektion, Otitis	Gering

Cholera-ähnlich (*V. cholerae* non-O1/O139)

Virulenzfaktoren:

kein Cholera-Toxin (pathogene Isolate kodieren Faktoren wie z.B. Enterotoxine, Hämolysine, Type III-Sekretionssysteme etc.)
Cholera-Toxin-kodierende Serogruppen (z.B. O141, O75, O37, O10: bisher ohne jegliches pandemisches Potenzial)

Vorkommen:

Ubiquitär (Deutschland)

Cholera (*V. cholerae* O1/O139)

Virulenzfaktoren: (Phagen-assoziiert: übertragbar!)

Cholera-Toxin (CTX)
Toxin-(ko)regulierter Pilus

Vorkommen:

Endemische Länder (z.B. Indien, Bangladesch etc.)

Vibrio Spezies mit einer hohen Bedeutung für den Verbraucherschutz

<i>Vibrio</i> spp.	Reservoir	Intestinale Erkrankung	Bedeutung	Extraintestinal Erkrankung	Bedeutung
<i>V. parahaemolyticus</i>	Wasser, Lebensmittel	Gastroenteritis	Sehr hoch	Wundinfektionen, Otitis	Gering

V. parahaemolyticus: Gastroenteritis

Virulenzfaktoren:

Hämolytine

TDH („thermostable direct hemolysin“)

TRH (TDH „related hemolysin“)

Kapsel, Type III-Sekretionssystem

Vorkommen:

Nordsee

Ostsee

Pandemischer O3:K6 Klon (*tdh*)

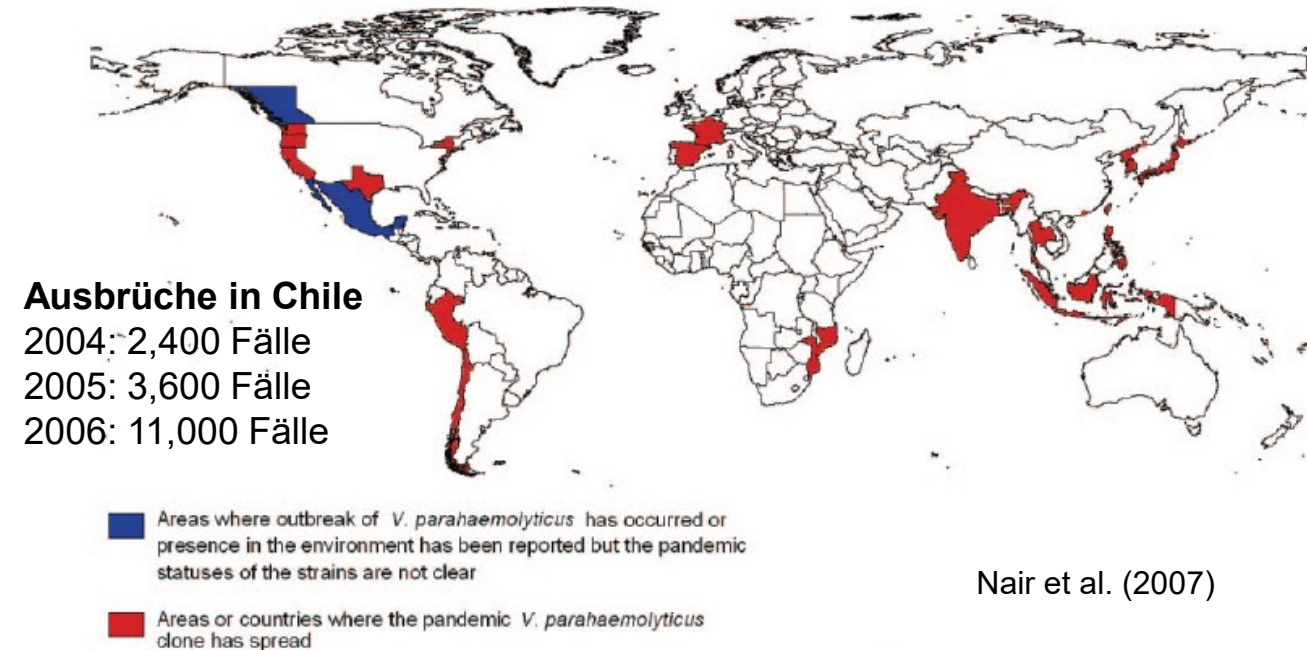


FIG. 1. Global dissemination of the unique O3:K6 isolate of *Vibrio parahaemolyticus* and its serovariants.

Vibrio Spezies mit einer hohen Bedeutung für den Verbraucherschutz

Vibrio spp.	Reservoir	Intestinale Erkrankung	Bedeutung	Extraintestinal Erkrankung	Bedeutung
<i>V. alginolyticus</i>	Wasser, Lebensmittel	Gastroenteritis?	Gering	Wundinfektion, Otitis	Gerin/Mittel
<i>V. vulnificus</i>	Wasser, Lebensmittel	Gastroenteritis	Gering	Wundinfektion, Septikämien	Hoch

V. vulnificus/V. alginolyticus:
Wundinfektionen/Gastroenteritis

Virulenzfaktoren:
Multifaktoriell (problematisch für den Nachweis/Beurteilung)

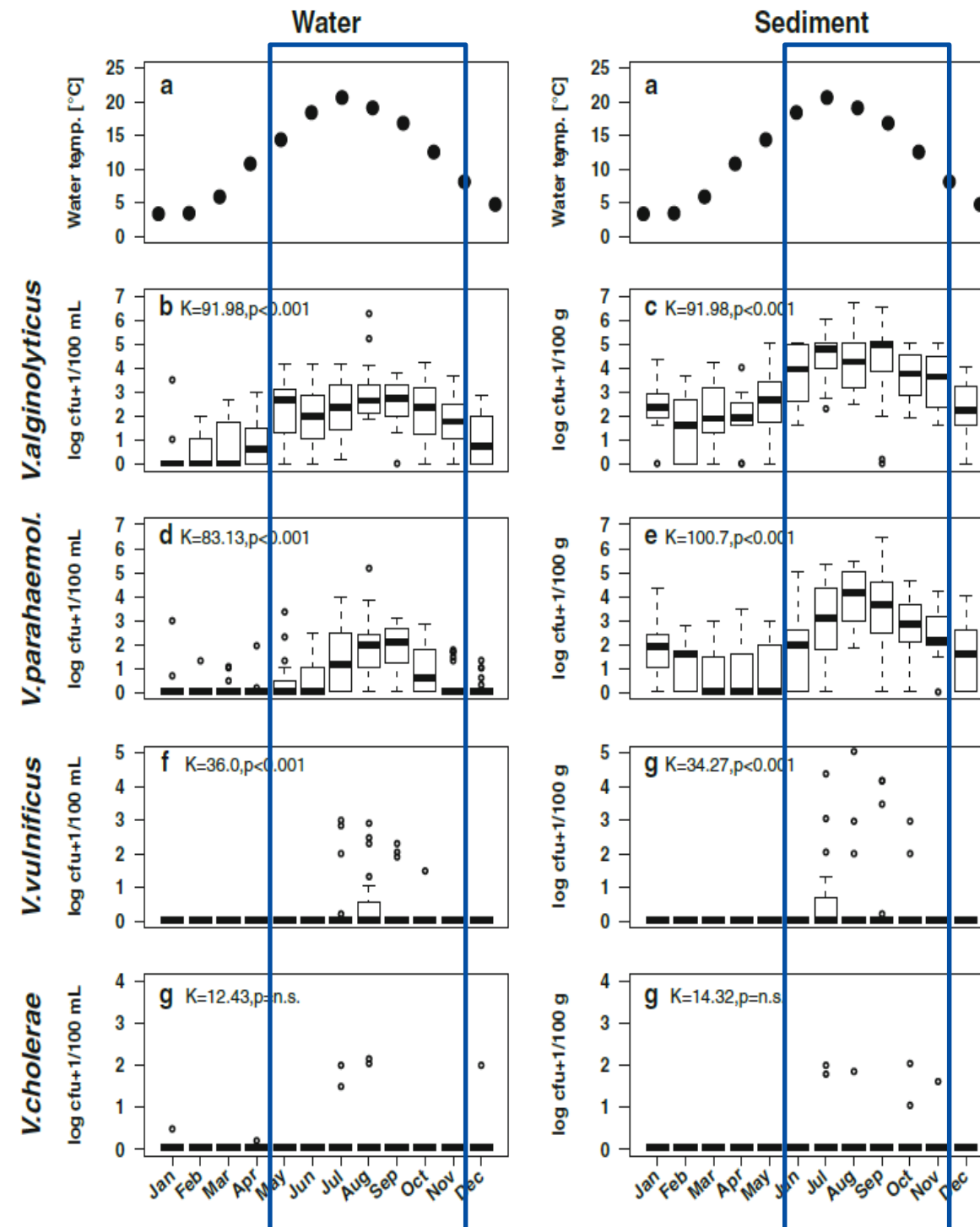
Vorkommen:
Ubiquitär

???

Faktoren, die das Vorkommen humanpathogener *Vibrio* spp. beeinflussen

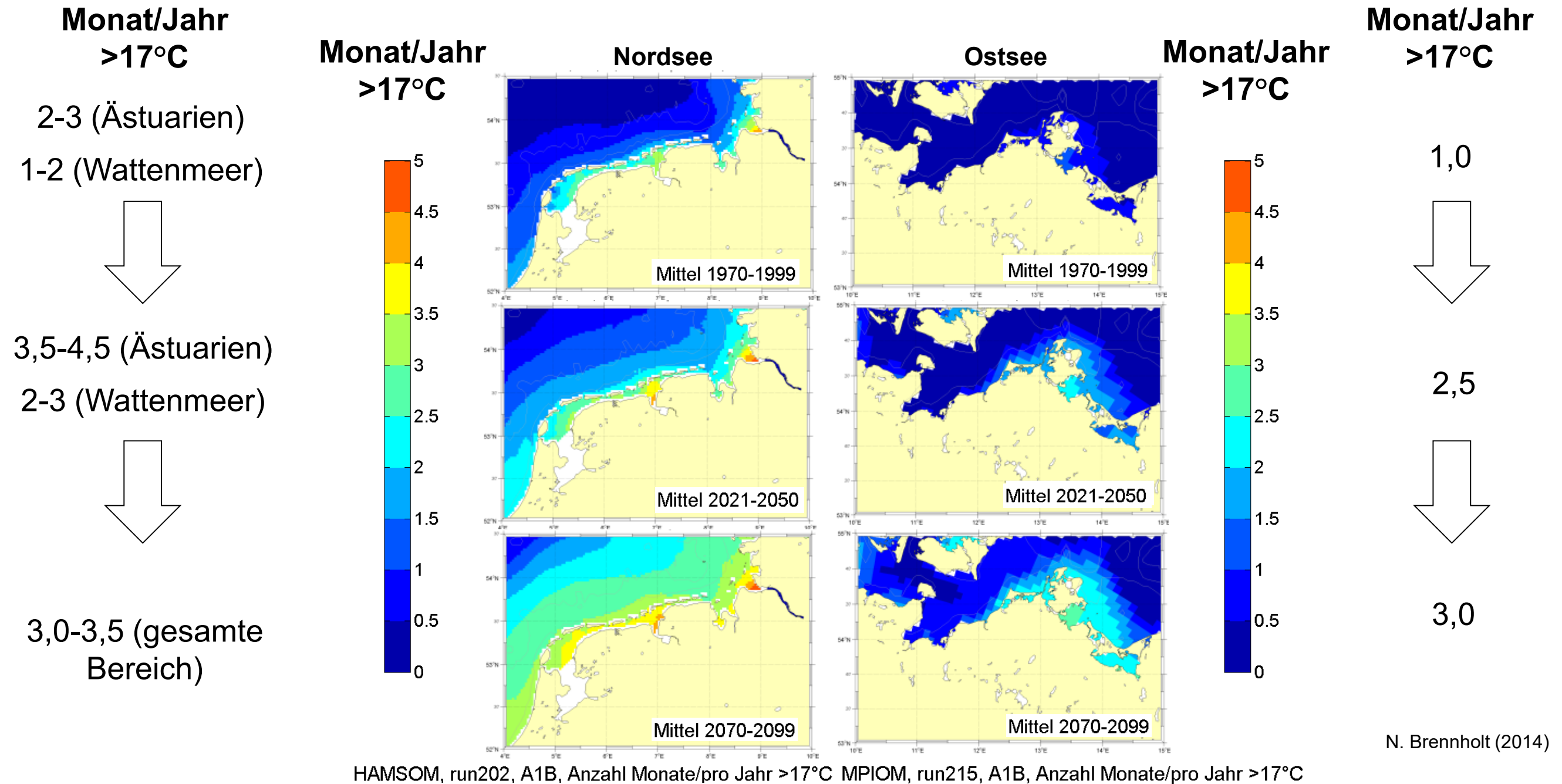
Wasser/Sediment-Studie (Böer et al. 2013)

Temperaturabhängiges Vorkommen
höhere Nachweisraten über die
Sommermonate (Badesaison)



Böer et al. (2013)

Model-basierte Perspektive im Rahmen des Klimawandels in Deutschland: Vorhersage zu Monaten mit Wassertemperaturen von >17°C



N. Brennholt (2014)

Faktoren, die das Vorkommen humanpathogener *Vibrio* spp. beeinflussen

Effekte des Klimawandels in Deutschland

(grunds. Anstieg der Temperaturen inkl. Wassertemp.)

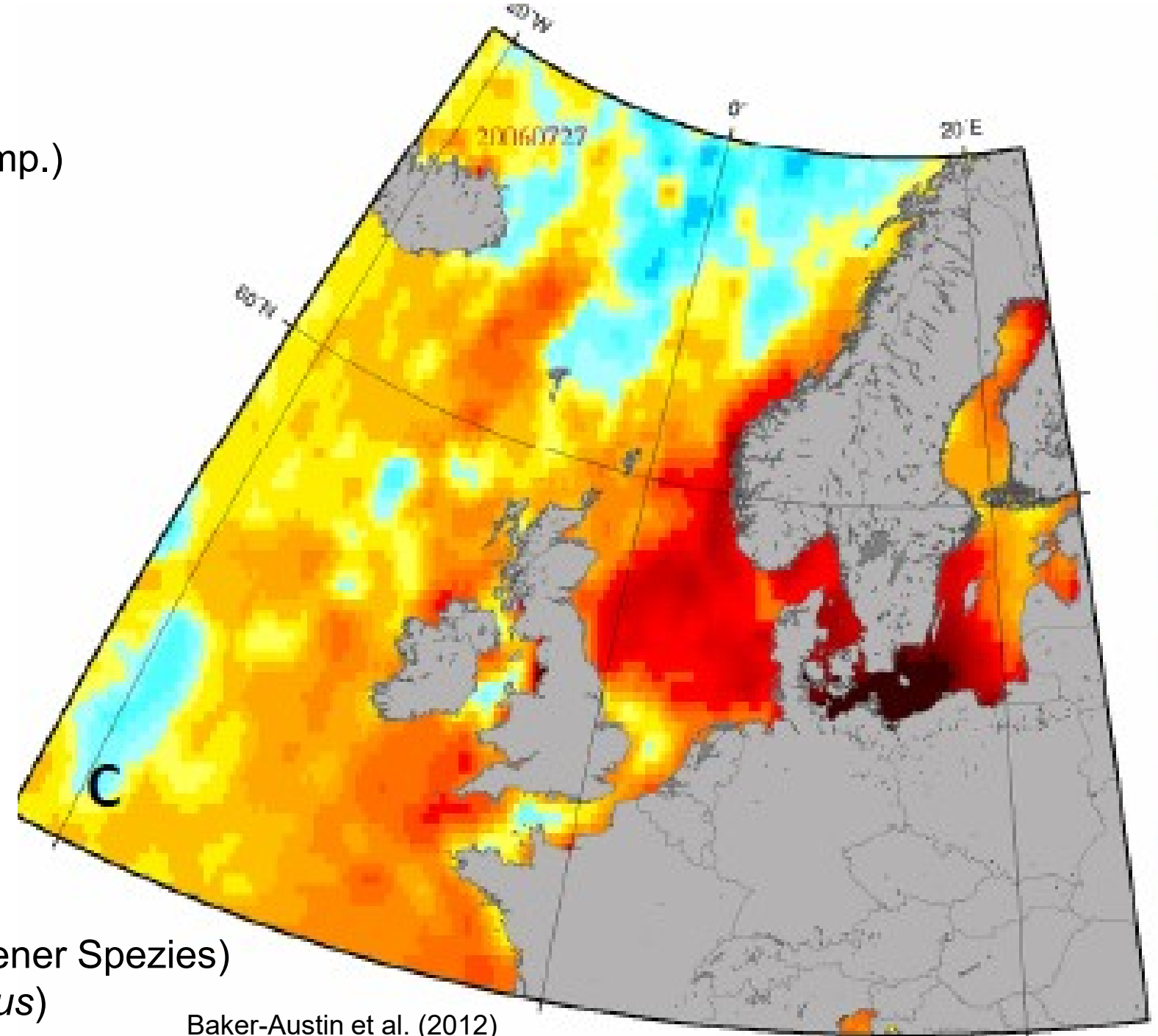
Auswirkungen...

- Fischereigebiete
- Muschel-/Austerproduktion (Aquakulturen)
- Garnelenproduktion
- Badestellen (Strände)
- Wild-/Nutztiere...

Ergebnis:

Anstieg des *Vibrio* spp. Vorkommens (inkl. pathogener Spezies)

Anstieg humaner Infektionen (ins. durch *V. vulnificus*)



Baker-Austin et al. (2012)

Pilotstudie:
**Vorkommen und Bedeutung von *Vibrio parahaemolyticus* in
importierten „Meeresfrüchten“**

Vorkommen von *V. parahaemolyticus* in importierten Garnelen (n=144)

Probennahme an der Grenzkontrollstelle

Verschiedene Garnelenarten (roh, gekocht, gefroren)

Kultureller Nachweis von Vibrionen

Identifizierung der Gattung und Spezies

Bereitstellung von 144 *V. parahaemolyticus*-Isolaten

Isolationsjahr

2015 (n=6)

2016 (n=16)

2017 (n=121)

2018 (n=1)

Herkunft

Equador (einschl. Galapagosinseln) (n=40)

Indien (n=34)

Bangladesh (n=26)

Vietnam (n=24)

Thailand (n=14)

Honduras (n=7)

Indonesien (n=2)



Konstanze Behrmann

Landesuntersuchungsamt Bremen,
Referat 20 - Mikrobiologie

Weiterführende Charakterisierung der *V. parahaemolyticus*-Isolate

Allgemeine Spezies-Charakterisierung

- massenspektrometrische Speziesidentifizierung (MALDI-ToF)
- molekulare Speziesbestätigung (*toxR* PCR)
- Analytical Profile Index (API20E)

Untersuchungen zum toxigenen Potenzial

- PCR Nachweis auf *trh/tdh*

144 *V. parahaemolyticus*
geringe API20E Unterschiede
2 *tdh*-positive Isolate

Phylogenetische Verwandtschaft

- PFGE

Antimikrobielle Resistenzuntersuchungen

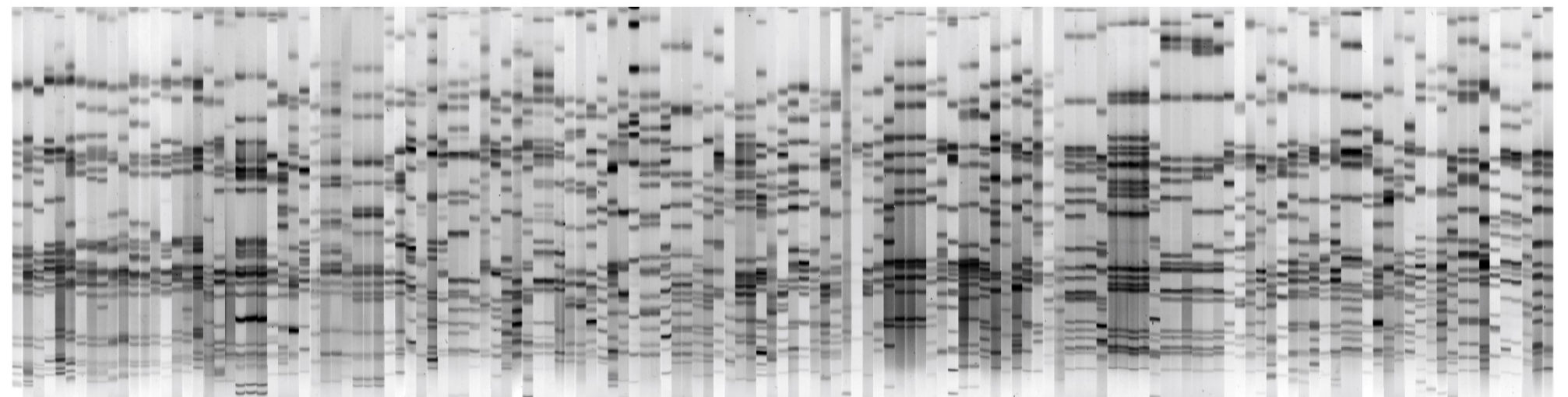
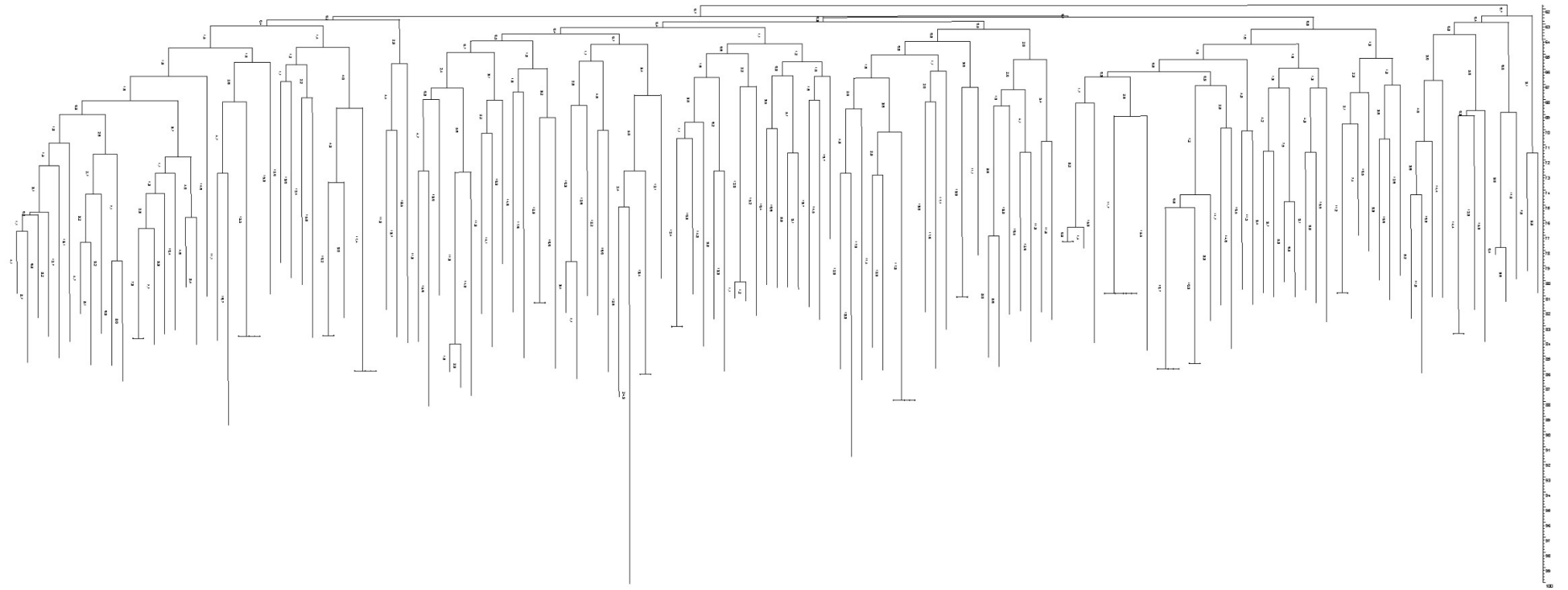
- Mikrodilutionsmethode (>15 Substanzen)

Gesamtgenomsequenzierung/bioinformatische Auswertung

V. parahaemolyticus-Isolate sind phylogenetisch sehr divers

SfiI-Makrorestriktion (SfiI-PFGE)

- hohe Diversität
- ähnliche Isolate oftmals aus gleicher Probe/Land/ Untersuchungszeitraum
- keine prädominanten klonalen Linien
- Untersuchung der antimikrobiellen Resistenz



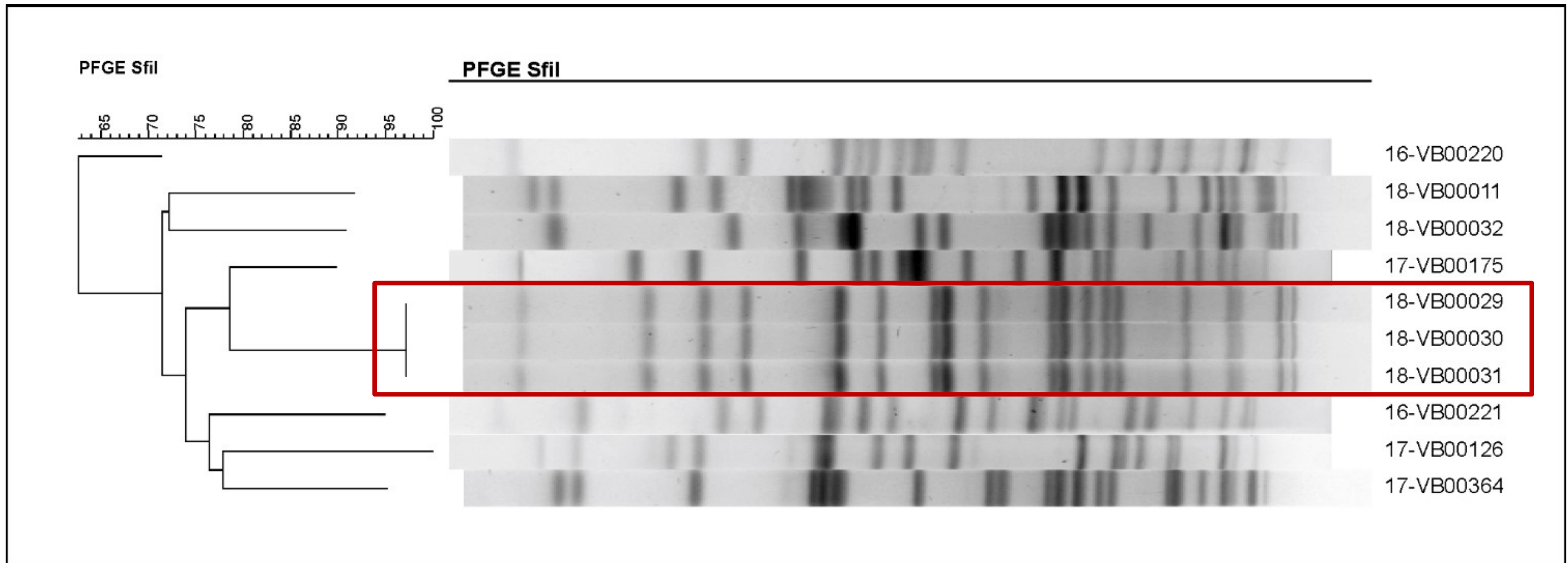
17-000004
17-000005
17-000006
17-000007
17-000008
17-000009
17-000010
17-000011
17-000012
17-000013
17-000014
17-000015
17-000016
17-000017
17-000018
17-000019
17-000020
17-000021
17-000022
17-000023
17-000024
17-000025
17-000026
17-000027
17-000028
17-000029
17-000030
17-000031
17-000032
17-000033
17-000034
17-000035
17-000036
17-000037
17-000038
17-000039
17-000040
17-000041
17-000042
17-000043
17-000044
17-000045
17-000046
17-000047
17-000048
17-000049
17-000050
17-000051
17-000052
17-000053
17-000054
17-000055
17-000056
17-000057
17-000058
17-000059
17-000060
17-000061
17-000062
17-000063
17-000064
17-000065
17-000066
17-000067
17-000068
17-000069
17-000070
17-000071
17-000072
17-000073
17-000074
17-000075
17-000076
17-000077
17-000078
17-000079
17-000080
17-000081
17-000082
17-000083
17-000084
17-000085
17-000086
17-000087
17-000088
17-000089
17-000090
17-000091
17-000092
17-000093
17-000094
17-000095
17-000096
17-000097
17-000098
17-000099
17-000100

V. parahaemolyticus (n=10) mit ESBL- bzw. Carbapenem-Resistenzen

- grundsätzlich nur geringe Resistenzausprägung (fast alle sensitiv gegenüber getesteten Antibiotika)

	AMP	CIP	COL	FOT	GEN	MER	SMX	TAZ	TET	TMP	FEP	ERP	FOX	IMP	TAX/ CLA	TAZ/ CLA
Sensibel	≤8	≤1	-	≤1	≤4	≤1	≤256	≤4	≤4	-	≤2	-	≤8	≤1	-	-
Intermediär	16	2	-	2	8	2	-	8	8	-	4-8	-	16	2	-	-
Resistent	≥32	≥4	-	≥4	≥16	≥4	≥512	≥16	≥16	-	≥16	-	≥32	≥4	-	-
16-VB00220-0	64	0.06	2	>64	4	≤0.03	32	>128	≤2	0.5	>32	≤0.015	8	≤0.12	≤0.06	≤0.12
16-VB00221-0	>64	0.03	4	>64	8	≤0.03	≤8	>128	≤2	1	>32	≤0.015	8	≤0.12	≤0.06	≤0.12
17-VB00126-0	>64	0.12	4	64	1	≤0.03	>1024	>128	≤2	>32	16	≤0.015	8	≤0.12	≤0.12	≤0.12
17-VB00175-0	64	0.06	8	64	8	≤0.03	>1024	>128	16	≤0.25	32	≤0.015	8	≤0.12	≤0.12	≤0.12
17-VB00364-0	>64	0.12	4	>64	1	≤0.03	>1024	2	8	>32	16	≤0.015	8	≤0.12	≤0.12	≤0.12
18-VB00011-0	>64	0.12	4	>64	1	≤0.03	>1024	4	8	>32	>32	≤0.015	8	≤0.12	≤0.12	≤0.12
18-VB00029-0	32	0.06	4	16	2	≤0.03	1024	1	8	>32	0.25	≤0.015	8	≤0.12	≤0.12	0.25
18-VB00030-0	32	0.12	4	16	1	≤0.03	>1024	2	16	>32	0.5	≤0.015	8	≤0.12	0.25	0.25
18-VB00031-0	32	0.12	8	16	2	≤0.03	>1024	1	16	>32	0.5	≤0.015	8	≤0.12	0.25	0.25
18-VB00032-0	>64	0.12	4	>64	2	0.12	≤8	>128	≤2	2	32	0.25	>64	1	>128	>128

Geringe phylogenetische Verwandtschaft unter den ESBL-produzierenden Isolaten



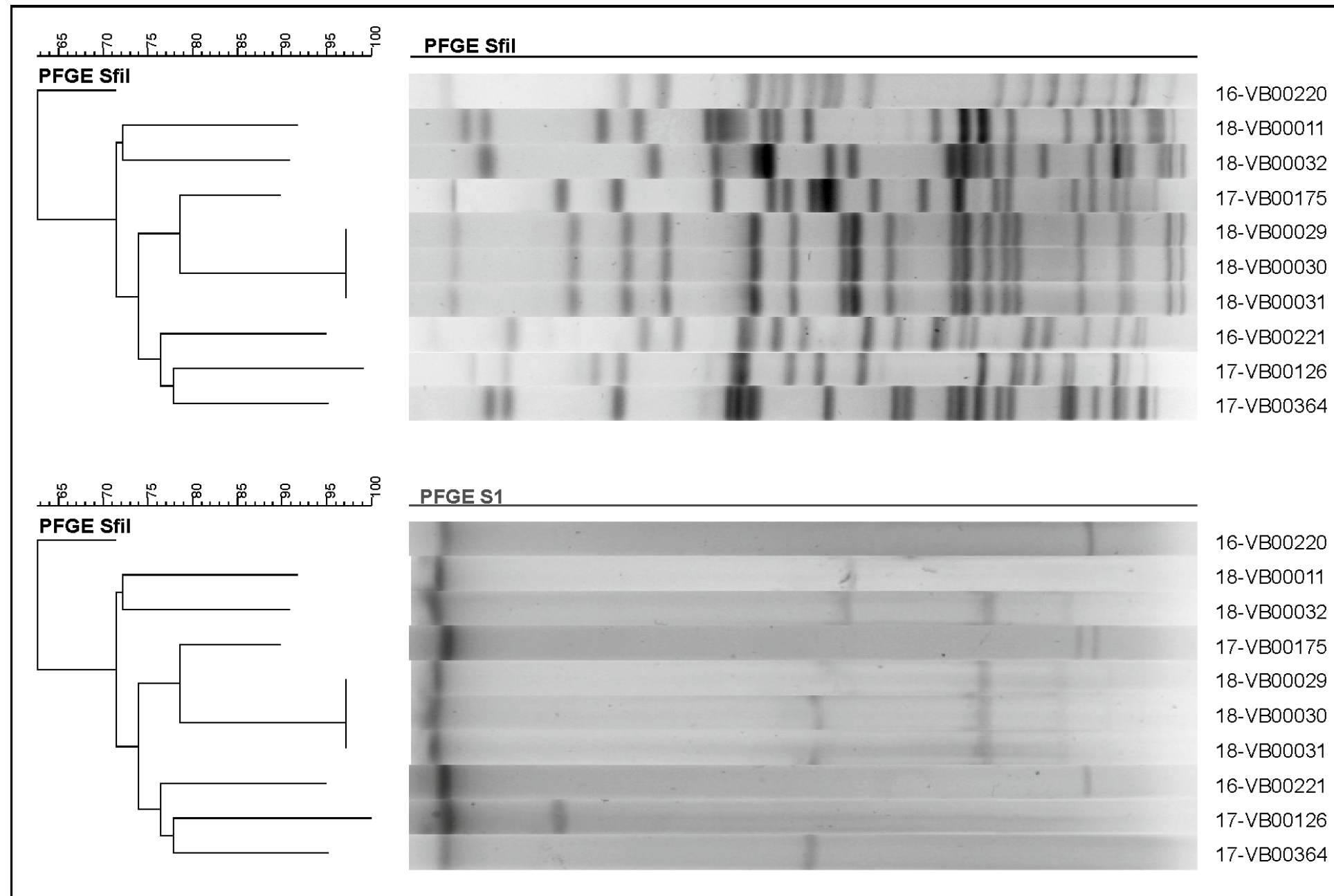
- Isolate mit gleichen SfiI-Profilen stammen aus der gleichen „Probe“
- Kein Hinweis auf prädominante klonale Linien mit ESBL-Resistenzen
- Plasmid-assoziierte ESBL-Gene?

Verschiedene Beta-Laktam Gene (*bla*) sind für den Resistenzphänotyp verantwortlich

Antibiotikum	16-VB00220	16-VB00221	17-VB00126	17-VB00175	17-VB00364	18-VB00011	18-VB00029	18-VB00030	18-VB00031	18-VB00032
Ampicillin	VEB-1, CARB-24	VEB-1, CARB-43	OXA-10, CARB-46	VEB-1, CARB-33	CARB-41, CARB-29, CARB-33 CTX-M-15,	CARB-43, CARB-35, CTX-M-15	CARB-46, CARB-27, CMY-4	CARB-27, CARB-46, CMY-4	CARB-46, CARB-27, CMY-4	CARB-29, NDM-1
Cefepime	VEB-1	VEB-1	-	VEB-1	CTX-M-15	CTX-M-15	-	-	-	NDM-1
Cefotaxime	VEB-1	VEB-1	-	VEB-1	CTX-M-15	CTX-M-15	CMY-4	CMY-4	CMY-4	NDM-1
Cefoxitin	VEB-1	VEB-1	-	VEB-1	-	-	CMY-4	CMY-4	CMY-4	NDM-1
Ceftazidime	VEB-1	VEB-1	-	VEB-1	CTX-M-15	CTX-M-15	CMY-4	CMY-4	CMY-4	NDM-1
Temocillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ertapenem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NDM-1
Imipenem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NDM-1
Meropenem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NDM-1

- übertragbare *bla*-Resistenzgene mit hoher Bedeutung im klinischen Bereich (ESBL-Plasmide?)

Sind mobile genetische Elemente für den Beta-Laktam Gene-Transfer verantwortlich?



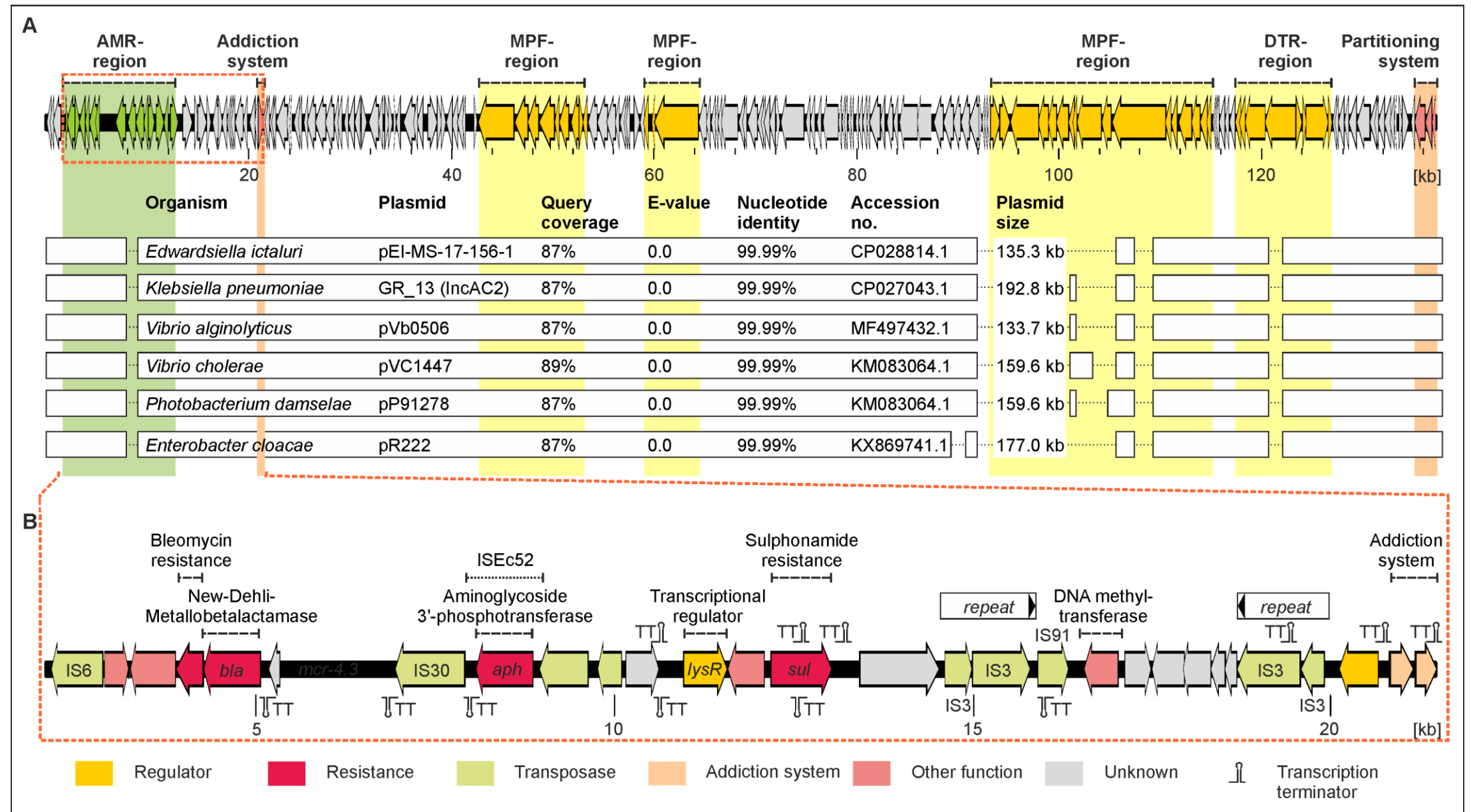
***bla*-Resistenzgene z.T. auf übertragbaren (konjugativen) Plasmiden kodiert**

- genetische Basis der ESBL-Resistenzen liefert z.T. Hinweis auf plasmidale Lokalisation (bekannte Plasmidreplikon-Sequenzen jedoch nur selten nachweisbar)
- Transfer der Plasmide in *E. coli* (Transformation, Selektion auf Cefotaxime (FOT))
- *in vitro* Transferuntersuchungen (Kreuzung bei 37°C, 24 h)
- Transfer in *E. coli* mit wenigen Ausnahmen erfolgreich
- Transkonjugaten zeigen ein vergleichbares Beta-Laktam Resistenzprofil wie Ausgangsisolate
- kaum weiteren Resistenzen (z.B. Sulfamethoxazole (SMX)) Plasmid-assoziiert
- z.T. sehr gute Transferraten innerhalb von *E. coli* nachweisbar (10^1 - 10^2 /Donor)
- bioinformatische Rekonstruktion der Plasmide (z.T. *long-read* Sequenzierung nötig)
- hohe Bedeutung von mobilen genetischen Elementen für den Transfer der *bla*-Resistenzgene

Carbapenem-Resistenzplasmid sehr gut von *Vibrio* in *Enterobacteriaceae* übertragbar

*bla*_{NDM-1} Plasmid

- ~140 kb
- Resistenzgene in 20 kb Region (IS-Elemente)
- Transferegene nachweisbar (konjugativ)
- unter natürlichen Bedingungen in *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella* etc. übertragbar



Zusammenfassung und Ausblick

- globaler Warentransfer: Ursache für den Import von multiresistenten und z.T. Toxin-kodierenden *Vibrio* spp. Isolaten aus asiatischen Ländern (unsachgemäßer Umgang mit Antibiotika in Aquakulturen oder Fischerei in kontaminierten Gewässern)
- Adaptation und Überdauerung spezifischer klonaler Linien in (aquatischen) Ökosystemen
- mögliche Adaptation der Bakterien an Nutztiere oder andere natürliche Reservoirs
- Übertragung von Resistenzen/Virulenzfaktoren in andere *Vibrio* spp. Spezies (oder andere Bakterien) möglich (untypische Spezies steigen hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung)

Was wir brauchen...

...zusätzliche Monitoring-Untersuchungen (Auftreten, Prävalenz, antimikrobielle Resistenz/Virulenzfaktoren), genetische Detailcharakterisierung von Isolaten (WGS), Untersuchungen zum horizontalen Gentransfer, Verbesserung der Nachweis und Typisierungsmethoden, Risikobewertungen und Management Strategien...

Wie steht es um das Vorkommen von *Vibrio* spp. in deutschen Aquakulturen?

***Vibrio* Vorkommen in Aquakulturen?**

(Mangel an Informationen und Kriterien zum Umgang mit positiven-Nachweisen)

Untersuchungen/Monitoring von...

- Aquakulturen (Fisch/Meerestiere)
- Toxin-Gen Nachweise (Toxinproduktion)
- Populationsdiversität/-dynamik
- Einfluss abiotischer Faktoren
- Unterstützung bei der Bereitstellung für die Überwachung bzw. Risikobewertung

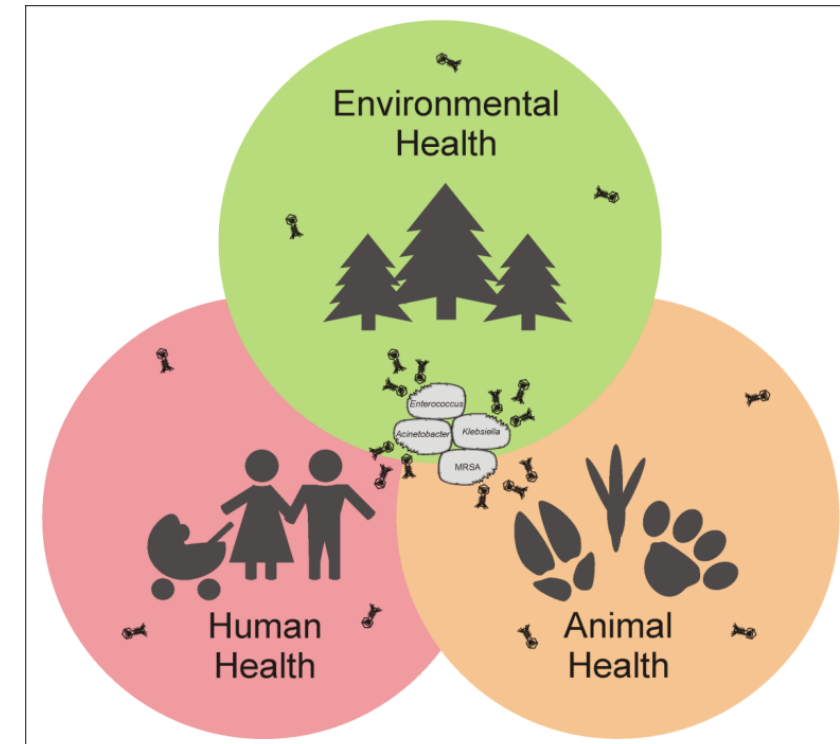
Danke für Ihre Aufmerksamkeit

Dr. Jens A. Hammerl

jens-andre.hammerl@bfr.bund.de



Identify Risks –
Protect Health



German Federal Institute for Risk Assessment

Max-Dohrn-Straße 8-10 • 10589 Berlin, GERMANY

Phone +49 30 - 184 12 - 0 • Fax +49 30 - 184 12 – 99 0 99

bfr@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de/en