

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

In Kooperation mit dem Bundeswehrkrankenhaus Hamburg und
dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Abteilung Infektionsepidemiologie

Leiter Prof. Dr. J. May

IDENTIFICATION OF NASAL COLONIZATION WITH β - LACTAMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE IN PATIENTS, HEALTH CARE WORKERS AND STUDENTS IN MADAGASCAR

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Volker Micheel
aus Malchin

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 02.12.2020

**Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/dieVorsitzende: Prof. Dr. Heiko Becher

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jürgen May

dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Barbara Schmalfeldt Prof. Dr. Klaus Ruckdeschel

Inhaltsverzeichnis

1. Originalarbeit der Publikationspromotion	4
2. Zusammenfassende Darstellung der Publikation	14
2.1 Einleitung	14
2.2 Material und Methoden	17
2.3 Resultate	23
2.4 Diskussion	26
2.5 Ausblick	29
3. Zusammenfassung	31
3.1 Deutsche Zusammenfassung	31
3.2 Englische Zusammenfassung	33
4. Abkürzungsverzeichnis	34
5. Literaturverzeichnis	35
6. Erklärung des Eigenanteils	44
7. Danksagung	45
8. Lebenslauf	46
9. Eidesstattliche Erklärung	47

IDENTIFICATION OF NASAL COLONIZATION WITH β -LACTAMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE IN PATIENTS, HEALTH CARE WORKERS AND STUDENTS IN MADAGASCAR

Volker Micheel¹, Benedikt Hogan², Rivo Andry Rakotoarivelo³, Raphael Rakotozandrindrainy⁴, Fetra Razafimanatsoa⁵, Tsiriniaina Razafindrabe⁴, Jean Philibert Rakotondrainiarivelo⁴, Sabine Crusius⁶, Sven Poppert⁷, Norbert Georg Schwarz², Jürgen May², Hagen Frickmann^{1,6,*,**} and Ralf Matthias Hagen^{1,*}

¹ Department of Tropical Medicine at the Bernhard Nocht Institute, German Armed Forces Hospital of Hamburg, Germany

² Infectious Disease Epidemiology Department, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine Hamburg, Germany

³ Infectious Disease Department, University Hospital Joseph Raseta de Befelatanana, Antananarivo, Madagascar

⁴ Department of Microbiology and Parasitology, University of Antananarivo, Madagascar

⁵ Laboratory Department, University Hospital Joseph Raseta de Befelatanana, Antananarivo, Madagascar

⁶ Institute for Microbiology, Virology and Hygiene, University Hospital Rostock, Germany

⁷ Institute for Medical Microbiology, Justus-Liebig-University Giessen, Germany

Received: Januar 2, 2015; Accepted: Januar 7, 2015

This study assesses the nasal occurrence of β -lactamase-producing Enterobacteriaceae both in patients in a hospital department of infectious diseases at admission and in healthy Madagascan students and health care workers.

Nasal swabs from 681 students, 824 health care workers, and 169 patients were obtained in Antananarivo, Madagascar, and transferred to Germany. Screening for β -lactamase (ESBL, ampC) producing Enterobacteriaceae was performed by cultural and molecular approaches, comprising Brilliance ESBL agar, E-testing, ABCD-testing, and commercial hplex ESBL and SuperBug ID PCR.

Regarding ESBL-positive strains and strains with resistance against at least three out of the four tested bactericidal antibiotic drugs, 0.3% (five out of 1541) of the students and health care workers group showed nasal colonization, whereas colonization was observed in 7.1% (12 out of 169) of the hospitalized patients at admission. No appreciably reduced detection rates after sample storage and intercontinental transport were observed.

A considerable proportion of nasal colonization with cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae was demonstrated in Madagascan hospital patients at admission, posing a risk of developing future endogenous infections. The nasal colonization of healthy individuals was negligible. Good storage and transport stability of Enterobacteriaceae will allow for future studies even in areas difficult to access.

Keywords: extended-spectrum β -lactamase, resistance, colonization, Enterobacteriaceae, Madagascar

Introduction

The increasing resistance of bacterial pathogens to antimicrobial drugs is a major public-health menace facing this century that does not spare tropical countries. In particular, extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae are known to be prevalent in Madagascan hospital patients [1–4], including populations at particular risks such as newborns

[1]. ESBL expression causes increased resistance to penicillins and cephalosporins, driven by a variety of molecular mechanisms [5, 6]. Among known mechanisms, *bla*_{CTX-M} expression (CTX = resistance to the WHO-listed antibiotic drug ceftriaxone, M = Munich, Germany, as the site of first description) is the most prevalent one in Madagascar, being detected in three out of four Madagascan ESBL-positive Enterobacteriaceae [4].

* Hagen Frickmann and Ralf Matthias Hagen equally contributed to this work.

** Corresponding author: Hagen Frickmann; Department of Tropical Medicine at the Bernhard Nocht Institute, German Armed Forces Hospital of Hamburg, Bernhard Nocht street 74, D-20359 Hamburg, Germany. Phone: 004940/694728743; Fax: 004940/694728709; E-mail: Frickmann@bni-hamburg.de

So far, little is known about the occurrence of ESBL-positive strains as colonizers in the healthy Madagascan population. We therefore performed a screening for ESBL strains as colonizers of the nasal vestibulum in relation to the total nasal colonization with Gram-negative rod-shaped bacteria. In the authors' own experience, nasal colonization with Enterobacteriaceae is frequent in resource-limited tropical countries, presumably due to limited access to facilities with adequate sanitary hygiene [7], although the gut is the major site of enterobacterial colonization. In an Israeli study, ESBL colonization of the upper airways was lower than colonization of the gut by a factor of 3–4 [8]. However, stool samples are much more difficult to obtain, particularly from healthy volunteers. In a previous Madagascan study using fresh stool samples, only patients from outpatient departments were included [3]. For these reasons, we chose to analyze the lower-yielding but more easily obtained nasal swabs to make adherence to the study protocol more likely. In a population with frequent nasal colonization with Gram-negative rod-shaped bacteria, even analyses from such atypical localizations might provide hints regarding the dimension of ESBL colonization if sampling from the gut or the inguinal region is difficult for logistic and socio-cultural reasons.

The primary focus of the analysis was nasal colonization with ESBL-positive strains both in apparently healthy Madagascan students and health care workers and in a small group of hospital patients at admission to hospital without risk of nosocomial transmission. The study's secondary objective was to assess the stability of ESBL-positive Enterobacteriaceae during storage and transport in the tropical setting. Such information is of importance in estimating the reliability of culture-based diagnostic results if an immediate cultural assessment is not possible and samples have to be transported over large distances to an appropriate laboratory facility.

Material and methods

Study population

Healthy volunteers

Nasal swabs (Amies w/o Ch, Copan Italia SpA, Brescia, Italy) from the nasal vestibulum were obtained from a group of 1541 healthy volunteers comprising students and health care workers from Antananarivo, Madagascar, and the nearby surroundings. There were no exclusion criteria. A total of 824 participants were health care workers (including students working in a hospital) (*Fig. 1*). All volunteers were asked to complete questionnaires to provide information on age, gender, residence, accommodation in a student hostel, study subject for students, job details for hospital workers, current or chronic diseases, recent hospital stays, and intake of antibiotics, as well as contacts with diseased persons or animals. Completed questionnaires were returned by 1505 of the volunteers. Age information was included in 1493 questionnaires; the median age was 23 years, ranging from 13 to 67 years. Gender information was provided in 1504 questionnaires; 66% of the participants were female.

Hospital patients

Nasal swabs were also collected from 169 patients from the Department of Infectious Diseases of the University Hospital Joseph Raseta de Befelatanana, Antananarivo, Madagascar directly at admission (*Fig. 1*). During the 6-month-sampling period, only patients with recent stays in intensive care units were excluded from the study. All other patients admitted were included. No samples were obtained from outpatient departments. All included patients completed a questionnaire to provide information on age, gender, residence, hospitalization, and intake of antibiotics during the previous 6 months, types of antibiot-

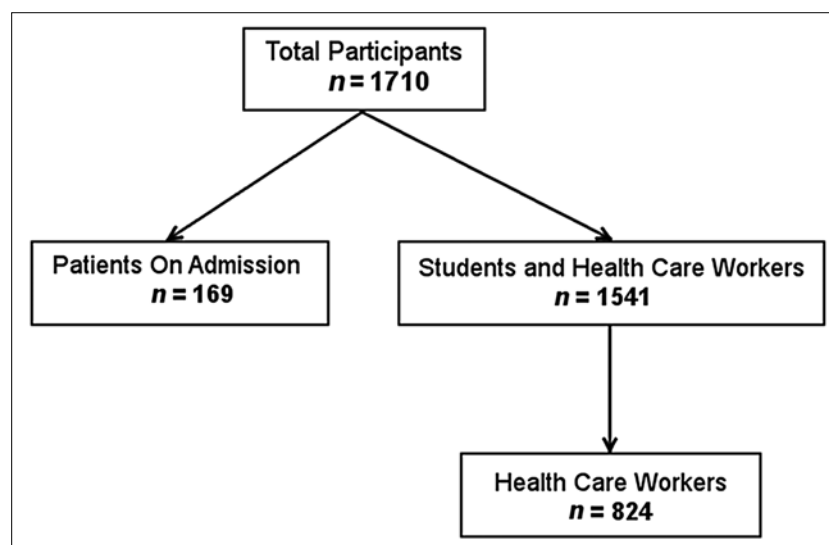


Fig. 1. Study populations. Two groups were analyzed, one comprising students and health care workers, the other comprising hospital patients at admission

ics used, chronic diseases, and professional contact with animals (Fig. 1). The median age was 34 years, ranging from 15 to 84 years; 41% of the patients were female.

Laboratory procedures

Screening for ESBL-positive Enterobacteriaceae

After sampling, the swabs were transferred to the laboratory, where they were stored at 4 °C. The storage and transport time ranged from 0 to 841 h (median: 53 h), depending on the geographical site of sampling. For nine samples, the transport time exceeded 300 h for logistical reasons. For 43 samples, the storage and transport time could not be documented.

After storage intervals ranging from 2 weeks to 4 months, several batches of 20 to 400 samples were transported by air to Hamburg, Germany. After arrival, all swabs were incubated in unselective thioglycolate enrichment broth (Heipha, Eppelheim, Germany) at 37 °C for 16–24 h to obtain maximum yields. Broth enrichment is known to double the yield of ESBL-expressing bacteria after swabbing in upper respiratory tract samples [9]. After broth enrichment, 10 µl of the incubated broths were cultured on nonselective Columbia agar enriched with 5% sheep blood (Oxoid, Basingstoke, UK), on MacConkey II agar (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), which is selective for Gram-negative rod-shaped bacteria, and on Brilliance ESBL selective agar (Oxoid, Basingstoke, UK), which is made for selective growth of ESBL-positive Enterobacteriaceae. The sensitivity of the ESBL agar is 94.9–97.9%, and the specificity, 95.7–100% [10, 11]. Agar plates were incubated at 37 °C for 40–48 h.

For all samples, growth of Gram-negative rod-shaped bacteria on MacConkey II agar was assessed without further differentiation. From Brilliance ESBL selective agar, all colonies that looked suspicious for Enterobacteriaceae (blue, green, brown colonies) were isolated for further investigations. From colonies that looked suspicious for Gram-negative nonfermentative rod-shaped bacteria (i.e., yellow or yellowish-brown or greenish-brown colonies), a subset of 14 out of 194 strains was representatively analyzed. All isolated colonies were stored at –80 °C in Microbank™ tubes (Pro-Lab Diagnostics, Bromborough, UK).

Testing of storage and transport stability of ESBL strains

For logistic reasons, two different approaches were chosen to assess the storage and transport stability of ESBL strains from sampling in Madagascar to analysis in Germany.

For the patient subgroup at the University Hospital Joseph Raseta de Befelatanana, Antananarivo, swabs were immediately smeared on Brilliance ESBL agar after sampling and prior to storage and transport. The agar plates were incubated at 37 °C for 48 h in the University Hospital Laboratory. Colonies on Brilliance ESBL agar that

looked suspicious for Enterobacteriaceae were isolated and shipped to Germany in addition to the swabs for further investigations.

For the subgroup of healthy students and health care workers, immediate analysis on Brilliance ESBL agar in Madagascar was impossible for logistic reasons. Therefore, commercial hyplex ESBL ID PCR (amPLEX, Giessen, Germany) targeting *bla*_{CTX-M} as the most frequent ESBL resistance mechanism in Madagascar [4] was applied to the swabs of a subset of 251 samples in Hamburg according to the manufacturer's instructions. As well as *bla*_{CTX-M} [6], the hyplex ESBL kit also targets β-lactamases of the *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV}-types [5] as well as the *bla*_{OXA-1} carbapenemase in a consensus approach, though without specificity for the expression of an ESBL phenotype. Positive signals of the *bla*_{CTX-M} PCR were correlated with cultural results on Brilliance ESBL agar, and positive signals of the β-lactamase consensus PCR, with the general growth of Enterobacteriaceae on MacConkey II agar.

Assessment of isolated strains

The strains isolated from Brilliance ESBL agar were identified by 16S rRNA gene sequencing and matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). A previously described 16S rRNA gene PCR targeting an 817-base-pair fragment was used [12–14]. Sequencing results were interpreted using the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guideline MM18-A “Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline” [15] as detailed [16]. MALDI-TOF-MS analysis was performed using a Shimadzu/Kratos “AXIMA Assurance” MALDI-TOF mass spectrometer (Shimadzu Germany Ltd., Duisburg, Germany) as described [14] with a minor modification. The databases Myla (version 3.2.0–6) and Saramis (version A2012/10 161150-219) were used for automated identification of the strains.

As well as Brilliance ESBL agar screening, the presence of ESBL- or AmpC-type resistance was confirmed or excluded by the commercial ABCD test kit Mast ID D68C (Mast Diagnostic, Amlens, France) as described by the manufacturer and others [17]. In addition, resistance testing was performed via E-tests (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) for piperacillin, ceftazidime, ciprofloxacin, and meropenem as representatives of the four important bactericidal antibiotic substance groups of penicillins, cephalosporins, fluoroquinolones, and carbapenems, respectively. E-test results were interpreted as sensitive, intermediate sensitive, and resistant in accordance with the EUCAST guideline (version 4.0, 2014, http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf). Multidrug resistance was accepted if ≤1 of the four substances tested sensitive in accordance with German national guidelines [18].

All strains isolated from the ESBL agar were analyzed using hyplex ESBL ID PCR (amPLEX, Giessen,

Germany) as described by the manufacturer. Strains that tested intermediate sensitive or resistant for meropenem were additionally assessed using hypex SuperBug ID PCR (amPLEX) [19] targeting the carbapenemase genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, and *bla_{NDM-1}* according to the manufacturer's instructions.

Analysis

Absolute occurrence as well as occurrence as a percentage of potential risk factors from the questionnaires was descriptively compared in study participants with and without proof of ESBL-positive strains and multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Relative risks were assessed for nonnumeric parameters. The age of the study participant groups with and without proof of ESBL-positive strains and multidrug-resistant Enterobacteriaceae was compared using nonparametric Mann-Whitney testing.

To reduce the risk of a bias due to die-off of bacteria from inappropriately handled swabs, only samples showing Gram-negative growth on MacConkey II agar were included in this assessment.

Ethical clearance

The study complied with the principles of the Helsinki Declaration of 1975 and with all subsequent amendments by the World Medical Assembly. All study participants provided written informed consent for the sampling. If minors/children were enrolled in the study, written informed consent of the next to kin, caretakers, or guardians were obtained. Ethical clearance was obtained from the Ethical Committee of the Ministry of Health of the Republic of Madagascar.

Results

Screening results after broth enrichment

Of 1541 samples obtained from students and health care workers, Gram-negative rod-shaped bacteria grew on MacConkey II agar from 816 samples and enterobacterial growth was observed on Brilliance ESBL agar for 37 study participants. The Enterobacteriaceae detected

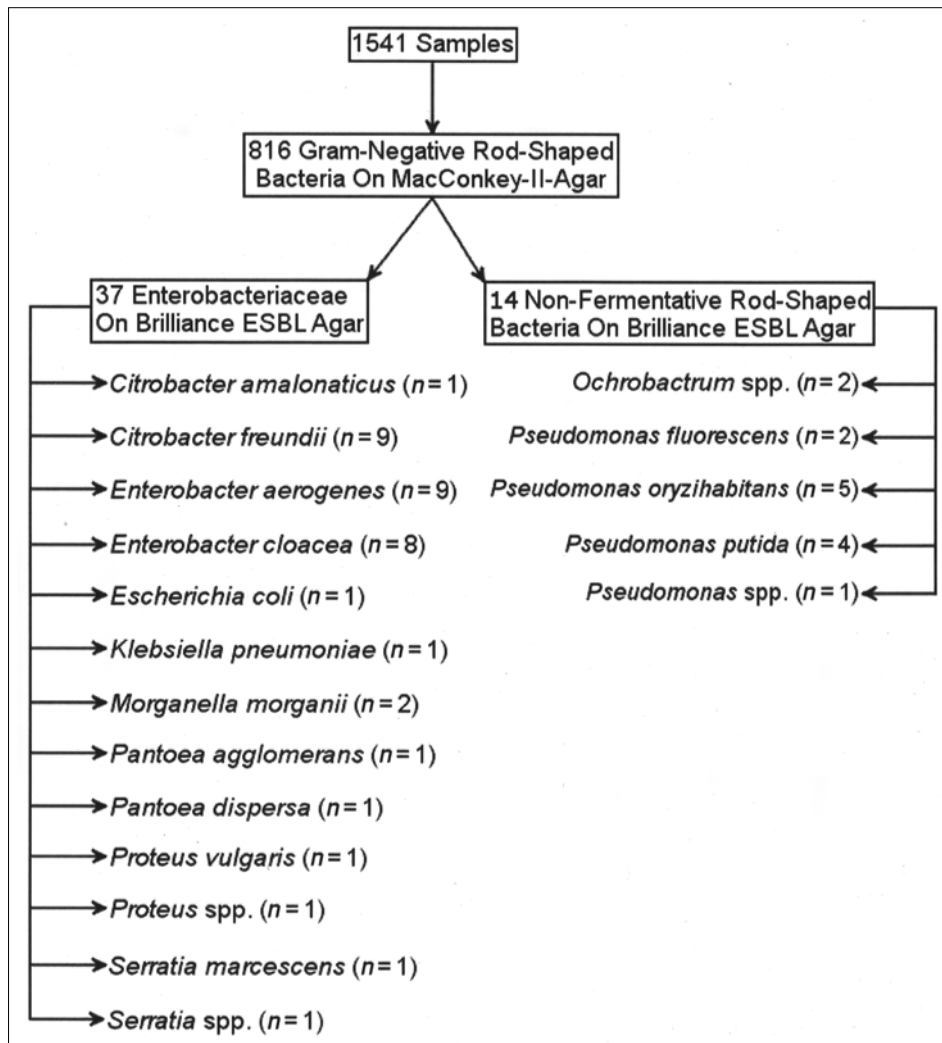


Fig. 2. Screening results of the students and health care workers group after broth enrichment and cultural growth on Brilliance ESBL agar

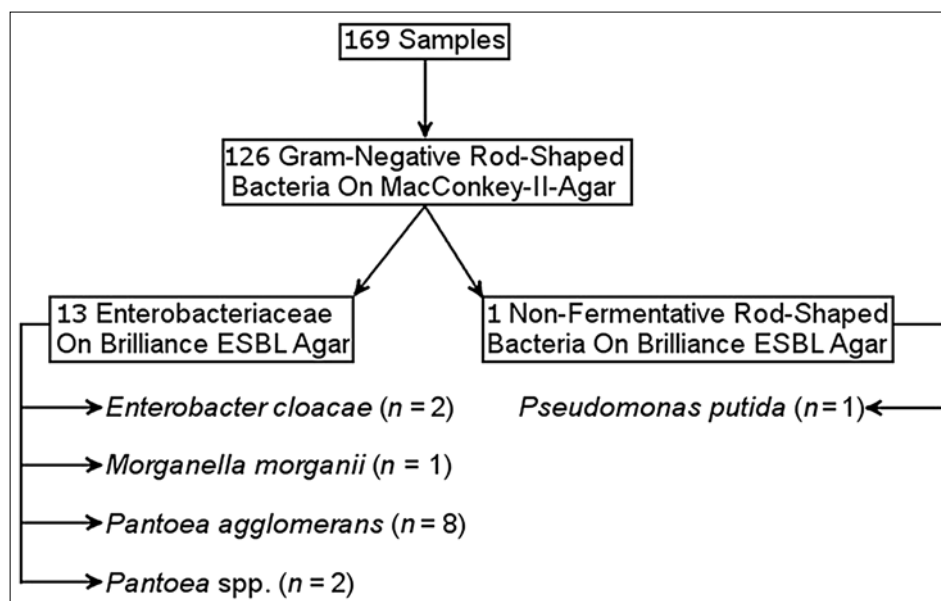


Fig. 3. Screening results of the patients group after broth enrichment and cultural growth on Brilliance ESBL agar

on Brilliance ESBL agar comprised *Citrobacter amalonaticus* ($n = 1$), *Citrobacter freundii* ($n = 9$), *Enterobacter aerogenes* ($n = 9$), *Enterobacter cloacae* ($n = 8$), *Escherichia coli* ($n = 1$), *Serratia marcescens* ($n = 1$), *Serratia* spp. ($n = 1$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 1$), *Morganella morganii* ($n = 2$), *Pantoea agglomerans* ($n = 1$), *Pantoea dispersa* ($n = 1$), *Proteus vulgaris* ($n = 1$), and *Proteus* sp. ($n = 1$) as identified by 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF-MS analysis. In addition, 14 out of 194 nonfermentative Gram-negative rod-shaped bacteria were representatively isolated and identified as *Ochrobactrum* spp. ($n = 2$), *Pseudomonas fluorescens* ($n = 2$), *Pseudomonas oryzae* ($n = 5$), *Pseudomonas putida* ($n = 4$), and *Pseudomonas* sp. ($n = 1$) (Fig. 2).

Of 169 samples from hospital patients obtained at admission, 126 showed Gram-negative rod-shaped bacteria growing on MacConkey II agar and 13 showed Enterobacteriaceae as well as 38 nonfermentative rod-shaped bacteria on Brilliance ESBL agar. The Enterobacteriaceae from Brilliance ESBL agar comprised *Enterobacter cloacae* ($n = 2$), *Morganella morganii* ($n = 1$), *Pantoea agglomerans* ($n = 8$), and *Pantoea* spp. ($n = 2$, further discrimination failed). Of the 38 Gram-negative nonfermentative rod-shaped bacteria on Brilliance ESBL, 1 was representatively isolated and identified as *P. putida* (Fig. 3).

ESBL confirmation testing and resistance testing

ABCD testing by Mast ID D68C confirmed an ESBL phenotype in 3 out of 37 isolated Enterobacteriaceae from the students and health care workers group and in 11 out of 13 isolates from the patients group. In addition, an AmpC phenotype was identified in 21 Enterobacteriaceae from the students and health care workers group and in 1 isolate from the patients group.

Bla_{CTX-M} expression was identified by commercial PCR in all 3 Enterobacteriaceae from the students and health care workers group for which ABCD testing had indicated an ESBL phenotype. For the patients group, *bla_C_{CTX-M}* expression was confirmed in four out of 11 isolates with ESBL phenotype in ABCD testing. The consensus PCR, targeting *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, and *bla_{OXA-1}*, was positive in 6 out of 37 isolates from the students and health care workers group and in 12 out of 13 enterobacterial isolates from the patients group (Table 1).

Multidrug-resistant Enterobacteriaceae were observed in four participants of the students and health care workers group and in 11 participants of the patients group, comprising two and ten ESBL-positive strains, respectively (Table 2). Multidrug-resistant strains were not observed among the 14 isolated nonfermentative Gram-negative rod-shaped bacteria from the students and health care workers group and the single isolate from the patients group.

A total of four isolates were tested intermediate sensitive or resistant to meropenem, comprising one ESBL-positive *Pantoea agglomerans* from the patients group and three nonfermentative Gram-negative rod-shaped bacteria. The latter comprised an intermediate sensitive *Pseudomonas putida* from the patients group and two intermediate sensitive *Pseudomonas putida* from the students and health care workers group. Commercial hyplex SuperBug ID PCR identified *bla_{OXA-48}* as a genetic determinant of carbapenem resistance in both intermediate sensitive *Pseudomonas putida* from the students and health care workers group.

Storage and transport stability

Among the samples from students and health care workers, 251 swabs were analyzed for *bla_{CTX-M}* and other

Table 1. Results of ABCD-testing and ESBL-PCR

Species	Results of ABCD testing			Results of hyplex CTX-M-type β -lactamase PCR and consensus PCR (targeting β -lactamase genes bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} and carbapenemase gene bla_{OXA-1})	
	Number of isolates	Number of ESBL positive isolates	Number of AMPC positive isolates	Number of CTX-M positive Isolates	Number of consensus positive isolates
Students and health care workers group					
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	9	0	5	0	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	9	0	7	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	1	6	1	1
<i>Escherichia coli</i>	1	1	0	1	1
<i>Klebsiella pneumonia</i>	1	1	0	1	1
<i>Morganella morganii</i>	2	0	2	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0	0	0	0
<i>Pantoea dispersa</i>	1	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0	0	0
<i>Proteus</i> spp.	1	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	1	0	0	0	0
<i>Serratia</i> spp.	1	0	1	0	0
Patients group					
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2	0	2	2
<i>Morganella morganii</i>	1	0	1	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	8	7	0	2	8
<i>Pantoea</i> spp.	2	2	0	1	2

β -lactamase genes by PCR as well as cultural assessment. Both PCR approaches led to positive signals in just one sample, from which a bla_{CTX-M} -positive *Enterobacter cloacae* could be grown on Brilliance ESBL agar and MacConkey II agar.

Among the 169 samples from patients, concordant culture results on Brilliant ESBL agar were observed in three instances. From all three swabs showing enterobacterial growth on Brilliance ESBL agar in Antananarivo, identical isolates were obtained by broth enrichment after transport of the swabs to Germany. Further, broth enrichment in Hamburg led to a total of ten additional Enterobacteriaceae on Brilliance ESBL agar that had not initially identified in Madagascar (Table 3).

Risk factor analysis

The low number of ESBL-positive or multidrug resistant Enterobacteriaceae in the students and health care workers group (5 [0.3%]) did not allow for a sound statistical risk factor analysis. In the hospital patients group, study participants carrying ESBL-positive or multidrug-resistant Enterobacteriaceae were compared with participants who did not but who were nasal carriers of Gram-negative rod-shaped bacteria. Study participants resident in Antananarivo were less frequently colonized than patients from the surrounding rural areas; otherwise, there was no detectable difference between the groups (Table 4). Colonized patients were significantly younger ($P = 0.0081$, Mann-

Table 2. Results of E-test-based resistance testing of multidrug-resistant isolates ($n = 15$) according to EUCAST interpretation guidelines

Species	Piperacillin	Ceftazidim	Meropenem	Ciprofloxacin
Students and health care workers group				
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R
<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	S	R
Patients group				
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R
<i>Pantoea agglomerans</i>	R	R	R	R
<i>Pantoea agglomerans</i>	R	R	S	R
<i>Pantoea agglomerans</i>	R	R	S	R
<i>Pantoea agglomerans</i>	R	R	S	R
<i>Pantoea agglomerans</i>	R	R	S	R
<i>Pantoea agglomerans</i>	R	R	S	R
<i>Pantoea agglomerans</i>	R	R	S	R
<i>Pantoea agglomerans</i>	R	R	S	R
<i>Pantoea sp.</i>	R	R	S	R

R, resistant; S, sensitive

Table 3. Culture results on Brilliance ESBL agar directly in Madagascar and after broth enrichment in Germany

Species	Growth on ESBL agar in Antananarivo without broth-enrichment	Growth on ESBL agar in Germany after broth-enrichment
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2
<i>Morganella morganii</i>	0	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	8
<i>Pantoea spp.</i>	0	2

Whitney test; mean age \pm standard deviation [SD] 26 ± 8.3 years) than noncolonized patients (mean age \pm SD 37.9 ± 15.6 years).

Discussion

The occurrence of ESBL-positive Enterobacteriaceae in Madagascan hospitals has been described repeatedly [1–4]. Here, we screened healthy volunteers and patients at admission for ESBL-positive or multidrug resistant enterobacterial colonization in the nasal vestibulum. The numbers of ESBL-positive or multidrug-resistant Enterobacteriaceae detected were respectively three and four out of 1541 samples from students and health care workers and 11 and 11 out of 169 patients. Cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae were isolated from 37 students and health care workers and 13 hospital patients from ESBL selective agar.

Our data suggest that the colonization of healthy Madagascans with ESBL-positive or multidrug-resistant Enterobacteriaceae is low. Although the nose is not the primary site of human ESBL colonization, the observed high nasal colonization rate of 53.0% (816 out of 1541 samples) with Gram-negative rod-shaped bacteria is indicative of a low percentage of ESBL among colonizing Enterobacteriaceae in Madagascar. Of note, analysis of nasal ESBL colonization only makes sense if high rates of nasal carriage of Gram-negative rod-shaped bacteria are guaranteed. This has been described for countries with restricted sanitary hygiene [7]. The low number of carriers with ESBL-positive or multidrug-resistant colonization did not allow for a risk factor analysis in the students and health care workers group.

In contrast, a considerably higher rate of cephalosporin-resistant Gram-negative colonization was detected in hospital patients at admission. The quantitatively dominant *Pantoea spp.* are phylogenetically closely related to

Table 4. Distribution of epidemiological risk factors among carriers and noncarriers of ESBL-positive strains and/or multidrug-resistant strains from the patients group in absolute numbers/total numbers of the group (and percent)

Risk factors	Risk factor present	ESBL-positive or multidrug-resistant colonizing bacteria	RR (95% CI)
Number of patients with colonization		12	
Female sex	Positive	10.1% (7/69)	2.0
	Negative	5.3% (5/95)	(0.7–6.1)
Beta-lactam antibiotic drugs during the last 6 months*	Positive	4.9% (4/82)	0.7
	Negative	7.5% (5/67)	(0.2–2.3)
Any antibiotic drugs during the last 6 months*	Positive	6.6% (7/106)	1.4
	Negative	4.7% (2/43)	(0.3–6.6)
Contact with animals	Positive	9.5% (4/42)	1.5
	Negative	6.3% (8/127)	(0.5–4.8)
Known chronic disease (not further specified)	Positive	10.6% (5/47)	1.9
	Negative	5.7% (7/122)	(0.6–5.6)
Residence in the capital Antananarivo	Positive	3.5% (4/115)	0.2
	Negative	14.8% (8/54)	(0.1–0.8)
Hospitalization within the last 14 days	Positive	10.7% (3/28)	1.7
	Negative	6.4% (9/141)	(0.5–5.8)

*Data were extractable from 149 out of 169 questionnaires only
RR, relative risk

Enterobacter spp. [20] which are on rank eight of nosocomially transmitted patient isolates [21]. *Pantoea* spp. have been infrequently isolated in Madagascar [3] and can be associated with human disease and nosocomial spread [22–24].

Residence outside the capital Antananarivo represented a risk factor that was frequently observed in hospitalized carriers in association with ESBL-positive or multidrug-resistant colonization, and colonized patients were younger than noncolonized ones in this descriptive, hypothesis-forming study. The reasons remain speculative.

Our data from newly admitted patients suggest that a considerable proportion of cephalosporin-resistant colonization in Madagascan hospitals is not caused by nosocomial transmission. Rather, endogenous colonization is already present at the time of admission, reducing the effect of hygiene precautions for the prevention of infections due to resistant bacteria. Potential further spread of these agents should be kept in mind and monitored in future national surveillance programs.

Among the ESBL-positive Enterobacteriaceae, *bla*_{CTX-M} was frequently observed in ESBL-positive strains. All ESBL-positive isolates from the students and health care workers group were *bla*_{CTX-M}-positive; four out of 11 ESBL-positive strains were *bla*_{CTX-M}-positive among the patients. These data are in line with previous investigations [4], which reported *bla*_{CTX-M} as accounting for 75.5% of ESBL-positive Enterobacteriaceae in Antananarivo. Interestingly, the AmpC-resistance type accounted for a considerable proportion of observed cephalosporin

resistance as well. These preliminary findings are of clinical importance regarding ceftriaxone being the antibiotic drug of choice for initial empirical antibiotic treatment in cases of suspected bacteremia or sepsis at the university hospital of Antananarivo. Furthermore, cultural demonstration of these life-threatening infections is not available for the majority of patients because of limited resources.

A considerable proportion (30% (15 out of 50)) of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae were multidrug-resistant, reducing the number of therapeutic options to fewer than two bactericidal antibiotic substance groups. While fluoroquinolone resistance was more frequently observed, lack of sensitivity to carbapenems was observed in only one enterobacterial isolate, a *Pantoea agglomerans* strain. Observed ESBL positivity of the respective strain and negative results in hypex SuperBug ID PCR might be compatible with porin loss or deficiency in this instance. Diagnostic assays to confirm this hypothesis are not established at our institutes. However, the absence of frequent carbapenemase genes in hypex SuperBug ID PCR makes it likely. In contrast, molecular characterization allowed the detection of carbapenem resistance in three out of 14 colonizing Gram-negative nonfermentative rod-shaped bacteria, two of them being *Pseudomonas* spp. harboring *bla*_{Oxa-48}.

As an interesting side effect, the study demonstrated a high degree of storage and transport stability of Gram-negative pathogens, facilitating future studies in resource-limited areas with transport of samples to well-equipped

laboratories for further sample assessment, at least if broth enrichment can be provided.

Conclusions

The study showed a considerable proportion of nasal colonization with cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Madagascan hospital patients at admission. Accordingly, the risk of endogenous infections due to such agents has to be considered. In contrast, the nasal colonization with cephalosporin-resistant or multidrug-resistant Enterobacteriaceae in the healthy Madagascan population is negligibly low.

Acknowledgements

The authors are grateful to Annett Michel and Steffen Lohr for excellent technical assistance. We also thank all participating health care workers and students as well as patients from the Befelatanana university hospital for taking part in the study.

Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest. PCR analyses and bacterial culture were funded by the German Ministry of Defence (MoD), scientific project number 13K2-S-451215 “Development/evaluation of diagnostic molecular procedures for the diagnosis of infectious agents and symptom-based diagnostic procedures for tropical infectious diseases”. The funding source had no involvement in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

References

1. Andriatahina T, Randrianirina F, Hariniana ER, Talarmin A, Raobijaona H, Buisson Y, Richard V: High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric unit in Madagascar. *BMC Infect Dis* 10, 204 (2010)
2. Randrianirina F, Vaillant L, Ramarokoto CE, Adriamanarivo ML, Razafimahandry HC, Randiranomenjanahary J, Raveloson JR, Hariniana ER, Carod JF, Talarmin A, Richard V: Antimicrobial resistance in pathogens causing nosocomial infections in surgery and intensive care units of two hospitals in Antananarivo, Madagascar. *J Infect Dev Countries* 4, 74–82 (2010)
3. Herindrainy P, Randrianirina F, Ratovoson R, Ratsima Hariniana E, Buisson Y, Genel N, Decré D, Arlet G, Talarmin A, Richard V: Rectal carriage of extended-spectrum

beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in community settings in Madagascar. *PLoS One* 6, e22738 (2011)

4. Rakotonirina HC, Garin B, Randrianirina F, Richard V, Talarmin A, Arlet G: Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Antananarivo, Madagascar. *BMC Microbiol* 13, 85 (2013)
5. Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W, Thomson KS: Prevalence of newer beta-lactamases in Gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to J Clin Microbiol 44, 3318–3324 (2006)
6. Pitout JDD, Hossain A, Hanson ND: Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 42, 5715–5721 (2004)
7. Farida H, Severin JA, Gasem MH, Keuter M, van den Broek P, Hermans PW, Wahyono H, Verbrugh HA: Nasopharyngeal carriage of *Klebsiella pneumoniae* and other gram-negative bacilli in pneumonia-prone age groups in Semarang, Indonesia. *J Clin Microbiol* 51, 1614–1616 (2013)
8. Friedmann R, Raveh D, Zartzer E, Rudensky B, Broide E, Attias D, Yinnon AM: Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing enterobacteriaceae among patients during hospitalization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30, 534–543 (2009)
9. Murk JLAN, Heddema ER, Hess DLJ, Boogards JA, Vandebroucke-Grauls CM, Debets-Ossenkopp YJ: Enrichment broth improved detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing bacteria in throat and rectal surveillance cultures of samples from patients in intensive care units. *J Clin Microbiol* 30, 534–542 (2009)
10. Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Guisset A, Glupczynsky Y: Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 48, 2091–2096 (2010)
11. Ongut G, Daloglu AE, Bayson BO, Daglar D, Ogunc D, Sekercioglu AO, Colak D, Gunseren F: Evaluation of a chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Lab* 60, 1213–1215 (2014)
12. Cilia V, Lafay B, Christen R: Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol Biol Evol* 13, 451–461 (1996)
13. Hagen RM, Frickmann H, Elschner M, Melzer F, Neubauer H, Gauthier YP, Racz P, Poppert S: Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* by fluorescence in situ hybridization (FISH) from culture and paraffin-embedded tissue samples. *Int J Med Microbiol* 301, 585–590 (2011)
14. Frickmann H, Christner M, Donat M, Berger A, Essig A, Podbielski A, Hagen RM, Poppert S: Rapid discrimination of *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, and *H. haemolyticus* by fluorescence in situ hybridization (FISH) and two matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) platforms. *PLoS One* 8, e63222 (2013)
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008): Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by

- DNA target sequencing. Approved standard MM18-A, 1st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, pp. 30–34
16. Justesen US, Skov MN, Knudsen E, Holt HM, Sogaard P, Justesen T: 16S rRNA gene sequencing in routine identification of anaerobic bacteria isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol* 48, 946–948 (2010)
 17. Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ: Comparison of methods for AmpC beta-lactamase detection in Enterobacteriaceae. *J Med Microbiol* 60, 715–721 (2011)
 18. Mattner F, Bange FC, Meyer E, Seifert H, Wichelhaus TA, Chaberny IF: Preventing the spread of multidrug-resistant gram-negative pathogens: recommendations of an expert panel of the German Society for Hygiene and Microbiology. *Dtsch Arztebl Int* 109, 39–45 (2012)
 19. Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann SG: Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae by a commercial multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 50, 3115–3118 (2012)
 20. Delétoile A, Decré D, Courant S, Passet V, Audo J, Grimont P, Arlet G, Brisse S: Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *J Clin Microbiol* 47, 300–310 (2009)
 21. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A, Limbago B, Fridkin S, National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities: Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–Infect Control Hosp Epidemiol 34, 1–14 (2013)
 22. Bicudo EL, Macedo VO, Carrara MA, Castro FF, Rage RI: Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* in a pediatric urgent care center. *Braz J Infect Dis* 11, 281–284 (2007)
 23. Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH: *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J Clin Microbiol* 45, 1989–1992 (2007)
 24. Liberto MC, Matera G, Puccio R, Lo Russo T, Colosimo E, Focà E: Six cases of sepsis caused by *Pantoea agglomerans* in a teaching hospital. *New Microbiol* 32, 119–123 (2009)

2. Zusammenfassende Darstellung

2.1 Einleitung

Die zunehmende Resistenzentwicklung bakterieller Krankheitserreger gegenüber Antibiotika stellt weltweit ein ernstzunehmendes Problem für öffentliche Gesundheitssysteme dar [Arias und Murray 2009]. Die Gesundheitssysteme müssen sich mit multiresistenten Bakterienstämmen auseinandersetzen, welche unempfindlich gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika geworden sind. Solche, durch Erreger mit erweitertem Resistenzspektrum ausgelöste Infektionen, erhöhen die Mortalität, die Behandlungskosten und die Verweildauer im Krankenhaus [Rubin et al. 1999, Melzer und Petersen 2007, Mauldin et al. 2010, Nieminen et al. 2017, Inagaki et al. 2019].

Verursachen können diese Infektionen zum Beispiel Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin resistente *Enterococcus spp.* (VRE) und immer häufiger auch *Enterobacteriaceae*, welche fähig sind Beta-Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL) zu bilden.

Enterobacteriaceae sind eine homologe Gruppe gramnegativer Stäbchenbakterien, die speziesabhängig schon als Wildtyp fähig sein können, chromosomal kodierte Beta-Laktamasen wie Penicillinasen oder Cephalosporinasen zu exprimieren [Medeiros 1997]. Gegen Ende des 20. Jahrhunderts wurden gezielt Beta-Laktam-Antibiotika entwickelt, die gegenüber diesen Beta-Laktamasen stabil sind. So wurden auch die Oxyimino-Cephalosporine wie Cefotaxim, Ceftriaxon, und Ceftazidim entwickelt, welche unempfindlich für die enzymatische Aktivität einer Vielzahl der natürlich vorhandenen, chromosomal kodierten Beta-Laktamasen sind [Bush et al. 1998]. Mit der breiten Nutzung der neuen Substanzen für die Therapie gram-negativer

Infektionen sind unter dem Selektionsdruck Erreger selektioniert worden, die in der Lage sind auch die neueren Cephalosporine mit der Hilfe von Beta-Laktamasen mit erweitertem Spektrum zu hydrolysieren. Die ESBL gehören zu den plasmidkodierten Serin- β -Laktamasen und sind in der Lage neben Amino- und Acylaminopenicillinen auch Cephalosporine der 3. Generation mit Ausnahme der Cephamyne zu hydrolysieren [Ambler 1980, Huovinen et al. 1988, Bush et al. 1995, Jacoby und Medeiros 1991]. In vitro lassen sich diese Enzyme durch Beta-Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam hemmen [Bush et al. 1995]. Mittlerweile sind über 200 verschiedene Typen von ESBL nachgewiesen worden [Bush et al. 2018]. Diese Typen lassen sich den Familien *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{PER}*, *bla_{VEB}*, *bla_{GES}*, *bla_{TLA}*, *bla_{BES}* und *bla_{OXA}* zuordnen [Kliebe et al 1985, Knothe et al. 1983, Sirot et al. 1987, Sougakoff et al. 1988, Barthélémy et al. 1988], wobei *bla_{CTX-M}* mittlerweile die häufigste Genotyp-Gruppe bei klinisch isolierten ESBL-Bildnern ist [Tzouveleakis et al. 2000, Woerther et al. 2013]. Abzugrenzen sind ESBL unter anderem von AmpC-Beta-Laktamasen, welche ebenfalls von Enterobacteriaceae und einigen Nonfermentern gebildet werden [Bush et al. 1995] und zu schwer zu therapierenden Infektionen führen können [Chow et al. 1991, Choi et al. 2008]. AmpC-Beta-Laktamasen vermitteln Resistenz gegenüber den meisten Penicillinen und Cephalosporinen der ersten und zweiten Generation. Unter antibiotischer Therapie kann es zu Überexpression der AmpC-Enzyme kommen, was die Erreger unempfindlich gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation macht [Livermore 1987]. Im Gegensatz zu ESBL können AmpC-Beta-Laktamasen Cephamyne hydrolysieren, werden aber deutlich weniger durch die oben genannten Beta-Laktamase-Inhibitoren gehemmt [Kazmierczak et al. 1990]. Auch sind in Patientenisolaten AmpC-Beta-Laktamasen häufiger im Chromosom als im Plasmid kodiert.

Das Problem zunehmend resistenter Erreger betrifft auch Gesundheitssysteme in tropischen Ländern mit potenziell eingeschränkten medizinischen Möglichkeiten wie z. B. Madagaskar. So konnten bei madagassischen Patienten [Andriatahina et al. 2010, Randrianirina et al. 2010, Herindrainy et al. 2011, Rakotonirina et al. 2013] und Risikopopulationen, darunter Neugeborene [Andriatahina et al. 2010], ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. Dabei wurde der *bla_{CTX-M}* Genotyp als häufigster Genotyp in 3 von 4 ESBL-positiven *Enterobacteriaceae* bestätigt [Rakotonirina et al. 2013]. Über die Verteilung ESBL-positiver Stämme bei gesunden Madagassen ist hingegen wenig bekannt. Aufgrund dessen führten wir ein Screening des nasalen Vestibulums zum Nachweis der Kolonisation mit ESBL-positiven Stämmen im Besonderen sowie zur nasalen Kolonisation mit gram-negativen Stäbchenbakterien im Allgemeinen durch. Erfahrungsgemäß ist die nasale Kolonisation mit *Enterobacteriaceae* in tropischen Ländern häufiger; möglicherweise aufgrund der eingeschränkten hygienischen Bedingungen [Farida et al. 2013]. Nach einer israelischen Studie ist die Kolonisation mit ESBL-exprimierenden Bakterien der oberen Atemwege um einen Faktor von 3 bis 4 kleiner als die des Darms [Friedmann et al. 2009]. Jedoch ist die Akquise von Stuhlproben von gesunden Studienteilnehmern weitaus schwieriger. Entsprechend entschieden wir uns für die weniger ertragreichen Nasenabstriche um die Adhärenz zum Studienprotokoll zu maximieren. In einer Bevölkerung mit häufigerer Kolonisation des nasalen Vestibulums mit gram-negativen Stäbchenbakterien können auch solche atypische Untersuchungsorte Rückschlüsse auf die Kolonisationsraten mit ESBL-Bildnern in den typischen Loci Darm und Leiste ermöglichen.

Der Schwerpunkt der Studie lag dementsprechend in der Untersuchung der nasalen Kolonisationsraten mit ESBL-positiven Stämmen bei gesunden, madagassischen Studenten und Arbeitnehmern im Gesundheitssystem, sowie bei einer kleinen Gruppe

von Patienten. Die Patienten wurden bei Aufnahme untersucht, so dass zu diesem Zeitpunkt noch kein Risiko einer nosokomialen Übertragung im Rahmen des Krankenhausaufenthalts bestand. Ein Nebenaspekt der Studie war die Untersuchung der Lagerungs- und Transportstabilität von ESBL-positiven *Enterobacteriaceae* in einer tropischen Umgebung. Solche Informationen sind wichtig für die Beurteilung der Verlässlichkeit von kultureller Diagnostik im Rahmen von Surveillance-Untersuchungen, wenn aus logistischen Gründen eine initiale Untersuchung nicht erfolgen kann und die Proben über eine große Distanz transportiert werden müssen.

2.2 Material und Methoden

Studienpopulation

Die erste Studienkohorte bestand aus einer Stichprobe aus 1541 gesunden Arbeitnehmern im Gesundheitssystem und Studenten aus Antananarivo und näherer Umgebung. Bei diesen Probanden wurde ein Nasenabstrich mittels Tupfer (Amies w/o Ch, Copan Italia SpA, Brescia, Italien) aus dem nasalen Vestibulum entnommen. Zusätzlich wurde ein Fragebogen mit Fragen zu Alter, Geschlecht, Tätigkeit, Wohnort bzw. Unterkunft im Studentenheim, Studiengang bzw. zu näheren Angaben zur Tätigkeit im Krankenhaus, zu akuter oder chronischer Krankheit, zu vergangenen Krankenhausaufenthalten, sowie zur Antibiotikaeinnahme und zum Kontakt zu kranken Personen oder Tieren ausgehändigt. Die Fragebögen wurden von 1505 Studienteilnehmern ausgefüllt und zurückgegeben. Das Geburtsdatum wurde in 1493 Fragebögen angegeben. Das Alter der Studienteilnehmer umfasste ein Spektrum von 13 bis 67 Jahren. Der Median lag bei 23 Jahren. Bei 1504 Fragebögen wurden ein Geschlecht angegeben. 66 % der Teilnehmer waren weiblich. Es gab keine Ausschlusskriterien.

Die zweite Studienkohorte bestand aus 169 Patienten der Station für Infektiologie des Universitätskrankenhauses Joseph Raseta de Befelatanana, Antananarivo, Madagaskar. Über einen sechsmonatigen Zeitraum wurden alle Patienten, die auf der Station aufgenommen wurden, in die Studie eingeschlossen. Bei Aufnahme wurden Ihnen ein Nasenabstrich abgenommen und ein Fragebogen ausgehändigt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Zustand nach vorherigem Aufenthalt auf Intensivstation sowie Patienten mit rein ambulanter Behandlung. Der Fragebogen beinhaltete Fragen zu Alter, Geschlecht und Wohnort, sowie zu vergangenen Krankenhausaufenthalten, Antibiotikaeinnahme in den letzten 6 Monaten, Art des eingenommenen Antibiotikums, chronischen Krankheiten und beruflichen Kontakt mit Tieren. Das Alter der Patienten reichte von 15 bis zu 84 Jahren bei einem Median von 34 Jahren. 41 % der Teilnehmer waren weiblich.

Labormethoden

Nach der Probenentnahme wurden die Tupfer zum lokalen Labor in Antananarivo, Madagaskar, transportiert und bei 4 °C gelagert. Die Zeit von Probenentnahme bis zur weiteren Untersuchung reichte von 0 bis zu 841 h, bei einem Median von 53 h, abhängig von der Entfernung zum Untersuchungslabor. Aus logistischen Gründen überschritt die Lagerungszeit bei 9 Proben mehr als 300 h. Bei 43 Proben konnten keine Zeiten bezüglich Lagerung und Transport dokumentiert werden. Nach Aufbewahrungszeiten von 2 Wochen bis 4 Monaten wurden Gebinde von 20 bis 400 Proben per Luftpost nach Hamburg versendet. Nach Ankunft wurden alle Tupfer in nicht selektiven Thioglycolat-Bouillons (Heipha, Eppelheim, Deutschland) bei 37 °C für 16-24 h angereichert, ein Verfahren, durch das die Chance auf Detektion von ESBL-exprimierenden Bakterien in Proben der oberen Atemwege verdoppelt werden kann [Murk et al. 2009]. Nach Anreicherung wurden jeweils 10 µl der inkubierten Bouillons

auf einerseits nicht selektiven Columbia-Agarplatten, angereichert mit 5 % Schafblut (Oxoid, Basingstoke, GB) und andererseits auf für gram-negative Stäbchenbakterien selektive MacConkey-II-Agarplatten (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) ausplattiert. Als Screening-Medium für die Detektion ESBL-positiver *Enterobacteriaceae* wurde der chromogene, selektive ESBL-Brilliance-Agar (Oxoid, Basingstoke, GB) verwendet, der eine Sensitivität von 94.9–97.9 % und einer Spezifität von 95.7–100 % aufweist [Huang et al. 2010, Ongut et al. 2014]. Die Agarplatten wurden bei 37 °C ohne CO₂-Zusatz für 40-48 h inkubiert.

Bei allen Proben wurde das Wachstum von Kultur-morphologisch typischen gram-negativen Stäbchenbakterien auf MacConkey-II-Agar zunächst ohne weitere Differenzierung erfasst. Ergänzend wurden vom selektiven ESBL-Brilliance-Agar alle Kolonien für weitere Untersuchungen subkultiviert, welche phänotypisch mit ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* vereinbar waren (blaue, grüne und braune Kolonien). Für eine Stichprobe von 14 aus 194 Proben wurden repräsentativ Kolonien mit gelber oder gelbbrauner Farbe mit dem Verdacht auf Wachstum von gram-negativen, nicht fermentierenden Stäbchenbakterien isoliert. Alle isolierten Kolonien wurden in Microbank™-Gefäßen (Pro-Lab Diagnostics, Bromborough, GB) bei -80 °C gelagert.

Entsprechend der unterschiedlichen Studienprotokolle wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet, um die Transport- und Lagerungsstabilität der ESBL-positiven Stämme beginnend von der initialen Untersuchung in Madagaskar bis hin zur weiteren Analyse in Deutschland zu untersuchen.

Für die Kohorte der Patienten des Universitätsklinikums Joseph Raseta de Befelatanana in Antananarivo wurden die Abstrichtupfer sofort nach Probengewinnung, also vor Lagerung und Transport, erstmals ohne Bouillonanreicherung auf Brilliance-ESBL-Agar ausgestrichen. Die Agarplatten

wurden bei 37 °C für 48 h im Labor des Universitätsklinikums inkubiert. Kolonien, welche morphologisch ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* entsprachen, wurden isoliert und für weitere Untersuchungen zusammen mit den Abstrichtupfern nach Deutschland transportiert.

Für die Kohorte bestehend aus gesunden Studenten und Krankenhausmitarbeitern konnte aus logistischen Gründen keine sofortige Untersuchung mittels ESBL-Brilliance-Agar auf Madagaskar erfolgen.

Ergänzend erfolgte für eine Gruppe von 251 Proben in Hamburg ein Screening auf den *bla_{CTX-M}*-Genotyp als häufigsten ESBL-Resistenzmechanismus in Madagaskar [Rakotonirina et al. 2013] via Hyplex ESBL ID PCR (amPLEX, Giessen, Deutschland). Zusätzlich zu dem *bla_{CTX-M}*-Genotyp [Pitout et al. 2004] erfasst das ESBL-ID-Kit auch Beta-Laktamasen vom *bla_{TEM}* and *bla_{SHV}*-Typ [Moland et al. 2006] sowie das Gen der *bla_{OXA-1}*-Betalaktamase in einem Konsensusverfahren. Der Nachweis vom *bla_{CTX-M}*-Genotyp via PCR wurde mit den kulturellen Ergebnissen des Brilliance ESBL Agar verglichen. Positive Ergebnisse im Konsensusverfahren wurden mit dem generellen Wachstum von *Enterobacteriaceae* auf MacConkey-II-Agar korreliert.

Die isolierten Stämme vom Brilliance-ESBL-Agar wurden mithilfe 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung und „matrix-assisted laser-desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry“ (MALDI–TOF–MS) identifiziert. Für die Identifizierung mittels rRNA-Gen-Sequenzierung wurde ein 817 großes Basenpaarfragment als Ziel für die PCR verwendet [Cilia et al. 1996, Frickmann et al. 2013]. Die Resultate der Sequenzierung wurden unter Beachtung der Guideline MM18-A “Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline” [Wayne 2008] der CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) interpretiert; wie andernorts im Detail beschrieben [Justesen 2010]. Die MALDI–TOF–MS Analysen wurden mit einem

Shimadzu/Kratos "AXIMA Assurance" MALDI–TOF Massenspektrometer (Shimadzu Germany Ltd., Duisburg, Deutschland) wie andernorts [Frickmann et al. 2013] beschrieben mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Für die Identifikation der Stämme erfolgte ein Abgleich mit den Datenbanken Myla (Version 3.2.0–6) und Saramis (Version A2012/10 161150-219).

Die Bestätigung der Screening Ergebnisse des Brilliance-ESBL-Agar im Sinne einer Identifikation des ESBL- oder AmpC-Phänotyps erfolgte durch das kommerzielle ABCD-Test-Kit Mast ID D68C (Mast Diagnostic, Amlens, Frankreich), wie durch Hersteller und andere Autoren beschrieben [Ingram et al. 2011]. Zusätzlich erfolgte die Resistenztestung via E-Test (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) auf Piperacillin, Ceftazidim, Ciprofloxacin, und Meropenem als Vertreter der 4 wichtigen bakteriziden Antibiotikagruppen zur Therapie gram-negativer Infektionen, der Acylaminopenicilline, Cephalosporine der dritten Generation, Fluorchinolone und Carbapeneme. Die Resultate wurden als sensitiv, intermediär oder resistent in Übereinstimmung mit den EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) Richtlinien [EUCAST 2014] interpretiert. Ein Stamm wurde als multiresistent definiert, wenn nur eine oder keine der vier Substanzen sensitiv getestet wurde [Mattner et al. 2012].

Die vom ESBL-Agar isolierten Stämme wurden mit der Hyplex-ESBL-ID-PCR (amPLEX, Giessen, Deutschland) nach Herstellerangaben untersucht. Meropenem-resistente und intermediär resistente Stämme wurden zusätzlich mit der Hyplex-SuperBug-ID-PCR (amPLEX) [Kaase et al. 2012] nach Hersteller-Richtlinien analysiert, welche den Genotyp einer Carbapenemase mit den Genen *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, und *bla_{NDM-1}* nachweisen kann.

Statistische Analyse

Die absolute Häufigkeit, sowie die prozentuale Häufigkeit potenzieller Risikofaktoren, entnommen aus den Fragebögen, wurden deskriptiv für Studienteilnehmer mit und ohne Nachweis ESBL-positiver Stämme und multiresistenter *Enterobacteriaceae* dargestellt. Relative Risiken für nicht numerische Parameter wurden ermittelt. Das Alter der Teilnehmer in den Gruppen mit und ohne Nachweis ESBL-positiver Stämme sowie sonstiger multiresistenter *Enterobacteriaceae* wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests verglichen.

Um das Bias-Risiko bedingt durch das zu erwartende Absterben von Bakterien angesichts der problematischen präanalytischen Bedingungen zu kontrollieren, wurden nur Proben mit gram-negativem Wachstum auf MacConkey-II-Agar in die Untersuchung einbezogen.

Ethikfreigabe

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den Prinzipien der Deklaration von Helsinki von 1975 und allen Änderungen durch den Weltärztebund durchgeführt. Alle Studienteilnehmer unterschrieben eine informierte Einwilligung für die Untersuchungen. Bei Minderjährigen oder nicht geschäftsfähigen Personen wurde die Einwilligung von Angehörigen oder Betreuern eingeholt. Die Ethikfreigabe wurde durch das Ethik-Komitee des Ministeriums für Gesundheit der Republik Madagaskar erteilt.

2.3 Resultate

In der Gruppe der Studenten und Krankenhausmitarbeiter konnte bei 1541 Proben in 816 Fällen ein Wachstum gram-negativer Stäbchenbakterien auf MacConkey-II-Agar verzeichnet werden. Dabei ließ sich für 37 Proben typisches Wachstum auf Brilliance-ESBL-Agar beobachten. Nach Analyse via 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung und MALDI-TOF-MS Analytik zeigte sich folgende Zusammensetzung: *Citrobacter amalonaticus* (n = 1), *Citrobacter freundii* (n = 9), *Enterobacter aerogenes* (n = 9), *Enterobacter cloacae* (n = 8), *Escherichia coli* (n = 1), *Serratia marcescens* (n = 1), *Serratia sp.* (n = 1), *Klebsiella pneumoniae* (n = 1), *Morganella morganii* (n = 2), *Pantoea agglomerans* (n = 1), *Pantoea dispersa* (n = 1), *Proteus vulgaris* (n = 1), und *Proteus sp.* (n = 1). Repräsentativ erfolgte für eine Gruppe von 14 aus 194 nicht fermentierenden, gram-negativen Stäbchenbakterien mit nicht enterobakterientypischem Wachstum auf Brilliance-ESBL-Agar ebenfalls eine Identifizierung: *Ochrobactrum spp.* (n = 2), *Pseudomonas fluorescens* (n = 2), *Pseudomonas oryzihabitans* (n = 5), *Pseudomonas putida* (n = 4), und *Pseudomonas sp.* (n = 1).

In der Patientenkohorte konnte bei insgesamt 169 Proben in 126 Fällen ein Wachstum gram-negativer Stäbchenbakterien auf MacConkey-II-Agar verzeichnet werden. Auf dem Brilliance-ESBL-Agar wurde bei 13 Proben ein typisches Wachstum für ESBL-positive Enterobakterien identifiziert. In 38 Fällen wurde ein Wachstum von nicht fermentierenden, gram-negativen Stäbchenbakterien mit nicht enterobakterientypischem Wachstum auf Brilliance-ESBL-Agar festgestellt. Nach Analyse via 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung und MALDI-TOF-MS-Analysen zeigte sich für die Probengruppe von 13 *Enterobacteriaceae* folgende Verteilung der Genera: *Enterobacter cloacae* (n = 2), *Morganella morganii* (n = 1), *Pantoea agglomerans* (n =

8), und *Pantoea spp.* (n = 2), wobei im letztgenannten Falle eine Bestimmung auf Speziesebene nicht gelang. Exemplarisch erfolgte für einen aus 38 nicht fermentierenden, gram-negativen Stäbchenbakterien mit nicht enterobakterientypischem Wachstum auf Brilliance-ESBL-Agar ebenfalls eine Identifizierung, wobei als Spezies *Pseudomonas putida* nachgewiesen wurde.

Der Resistenzphänotyp wurde mit dem ABCD-Test-Kit Mast ID D68C (Mast Diagnostic, Amlens, Frankreich) ermittelt. Für insgesamt 3 von 37 isolierten *Enterobacteriaceae* aus der Studenten- und Krankenhausmitarbeitergruppe und für 11 von 13 Isolaten aus der Patientenkohorte wurde phänotypisch ein ESBL-Phänotyp nachgewiesen. Zusätzlich konnten bei 21 Isolaten aus der Studenten- und Krankenhausmitarbeitergruppe, sowie bei einem Isolat aus der Patientenkohorte ein AmpC-Phänotyp festgestellt werden. Der *bla_{CTX-M}*-Genotyp wurde bei allen 3 ESBL-positiven *Enterobacteriaceae* in der Gruppe der Studenten und Krankenhausmitarbeiter via kommerzieller PCR als Ursache für den im ABCD-Test bestätigten ESBL-Phänotyp nachgewiesen. In der Patientengruppe konnte für 11 der 13 Stämmen mit ESBL-Phänotyp der *bla_{CTX-M}*-Genotyp nachgewiesen werden. Die Konsensus-PCR mit den Zielsequenzen *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, und *bla_{OXA-1}* erbrachte für 6 von 37 Isolaten in der Studenten- und Krankenhausmitarbeitergruppe und für 12 von 13 Stämmen aus der Patientengruppe ein positives Ergebnis.

Multiresistente *Enterobacteriaceae* wurden bei 4 Teilnehmern aus der Studenten- und Krankenhausmitarbeitergruppe und bei 11 Teilnehmern aus der Patientengruppe nachgewiesen. Davon waren jeweils 2 und 10 Stämme ESBL-positiv. Unter den exemplarisch untersuchten Nonfermentern konnten keine multiresistenten gram-negativen Stämme für die beiden untersuchten Kollektive nachgewiesen werden.

Insgesamt waren 4 Isolate resistent oder nur noch intermediär sensibel gegenüber Meropenem, darunter ein ESBL-positiver *Pantoea agglomerans* Stamm aus der Patientengruppe und 3 Nonfermenter-Isolate. Letztere setzten sich aus einem intermediär sensiblen *Pseudomonas putida* aus der Patientengruppe und 2 intermediär sensiblen *Pseudomonas putida* Isolaten aus der Studenten- und Krankenhausmitarbeiterkohorte zusammen. Bei beiden Nonfermenter-Isolaten der Studenten- und Krankenhausmitarbeitergruppe konnte der *bla*_{OXA-48}-Genotyp als Ursache der Meropenemunempfindlichkeit via kommerzieller Hyplex-Super-Bug-ID-PCR identifiziert werden.

In der Gruppe der Studenten und Krankenhausmitarbeiter wurden 251 Abstriche neben der kulturellen Analyse einem unmittelbaren Screening mittels PCR auf *bla*_{CTX-M} und andere Genotypen unterzogen. Der PCR Assay führte nur in einem einzigen Fall zu einem positiven Ergebnis. Dabei konnte ein ESBL-positiver *Enterobacter cloacae* via PCR und auch durch kulturelles Wachstum auf dem Brilliance-ESBL-Agar und dem Mac-Conkey-II-Agar nachgewiesen werden.

Unter den 169 Abstrichen der Patientengruppe konnten in 3 Fällen übereinstimmende kulturelle Ergebnisse mit dem Brilliance-ESBL-Agar beobachtet werden. Dabei wurden alle Stämme von allen 3 Abstrichtupfern mit initial positivem Wachstum auf Brilliance-ESBL-Agar in Antananarivo in Deutschland nach Bouillon-Anreicherung erneut erfolgreich angezogen. Weiterhin konnten durch Bouillon-Anreicherung 10 zusätzliche *Enterobacteriaceae* auf dem Brilliance-ESBL-Agar nachgewiesen werden, die bei Initialanzucht in Madagaskar noch nicht nachweisbar waren.

Die Anzahl an ESBL-positiven bzw. multiresistenten *Enterobacteriaceae* in der Gruppe der Studenten und Krankenhausmitarbeiter (5 [0.3 %]) war zu gering für eine verlässliche Risikofaktoranalyse. In der Gruppe der Patienten wurden

Studienteilnehmer mit Nachweis von Kolonisation mit ESBL-positiven oder multiresistenten *Enterobacteriaceae* mit Studienteilnehmern ohne Nachweis ESBL-positiver oder multiresistenter *Enterobacteriaceae* verglichen. Voraussetzung war, dass bei allen verglichenen Probanden eine nasale Besiedlung von gram-negativen Stäbchenbakterien nachgewiesen werden konnte. Studienteilnehmer mit Wohnort in Antananarivo waren seltener kolonisiert als Studienteilnehmer aus der ländlichen Umgebung. Ansonsten gab es keine nachweisbaren Unterschiede zwischen den Gruppen. Kolonisierte Patienten waren signifikant jünger ($P = 0.0081$ im Mann-Whitney Test; Altersdurchschnitt \pm Standardabweichung war 26 ± 8.3 Jahre) als nicht kolonisierte Patienten (Altersdurchschnitt \pm Standardabweichung war 37.9 ± 15.6 Jahre).

2.4 Diskussion

Das Auftreten ESBL-positiver *Enterobacteriaceae* in madagassischen Krankenhäusern wurde bereits vor der Durchführung dieser Untersuchung wiederholt beschrieben [Andriatahina et al. 2010, Randrianirina et al. 2010, Herindrainy et al. 2011, Rakotonirina et al. 2013]. In unserer Studie untersuchten wir gesunde Studenten und Arbeitnehmer im Gesundheitssystem sowie Patienten der Universitätsklinik bei stationärer Aufnahme auf nasale Kolonisation mit ESBL-positiven oder multiresistenten *Enterobacteriaceae*.

Dabei zeigten sich 3 ESBL-Bildner und 4 multiresistente *Enterobacteriaceae* aus insgesamt 1541 Abstrichen bei den Studenten und Arbeitnehmern im Gesundheitssystem. Bei den Patienten wurden 11 ESBL-Bildner und multiresistente *Enterobacteriaceae* aus 169 Abstrichen nachgewiesen. *Enterobacteriaceae* mit Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation wurden von 37

Studienteilnehmern der Studenten- und Arbeitnehmer-Kohorte und von 13 Teilnehmern der Patienten-Kohorte isoliert.

Diese Zahlen zeigen niedrige Kolonisationsraten mit ESBL-Bildnern oder multiresistenten *Enterobacteriaceae*. Auch wenn die Nase nicht der primäre Kolonisationsort für ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* ist, weist eine Kolonisationsrate von 53.0 % (816 von 1541 Proben) mit gram-negativen Stäbchenbakterien darauf hin, dass es nur eine geringe Rate von ESBL-Bildnern unter nasal kolonisierenden *Enterobacteriaceae* auf Madagaskar gibt. Verständlicherweise ist ein Screening auf nasale Kolonisation mit ESBL-Bildnern nur sinnvoll, wenn es in einem Setting stattfindet, indem hohe nasale Trägerraten mit gram-negativen Stäbchenbakterien zu erwarten sind. Dies wurde beschrieben für Länder mit eingeschränkten hygienischen Standards [Farida et al. 2013].

Die geringe Anzahl an mit ESBL-bildenden oder multiresistenten *Enterobacteriaceae* kolonisierten Studienteilnehmern der Studenten- und Arbeitnehmergruppe im Gesundheitssystem ließ keine Risikofaktoranalyse zu. Im Gegensatz dazu ließ sich eine deutlich höhere Kolonisationsrate mit *Enterobacteriaceae* mit Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen in der Gruppe der Patienten feststellen. Den quantitativ bedeutsamen Anteil der isolierten *Enterobacteriaceae* bildeten dabei *Pantoea* spp., die gelegentlich auf Madagaskar isoliert wurden und mit Erkrankungen sowie mit nosokomialen Übertragungen in Zusammenhang gebracht wurden [Bicudo et al. 2007, Cruz et al. 2007, Liberto et al. 2009]. Phylogenetisch sind *Pantoea* spp. eng mit *Enterobacter* spp. verwandt [Delétoile et al. 2009], die auf Rang 8 der nosokomial übertragenen Patientenisolat rangieren [Sievert et al. 2013].

Der Wohnsitz der Betroffenen außerhalb der Hauptstadt Antananarivo sticht als Risikofaktor in Assoziation mit Kolonisation durch ESBL-positive- und/oder

multiresistente *Enterobacteriaceae* hervor. Weiterhin ließ sich beobachten, dass kolonisierte Patienten jünger waren als Nichtkolonisierte. Mögliche Gründe bleiben spekulativ, denkbar wären beispielsweise besonders eingeschränkte Hygienebedingungen oder Tierkontakte im ländlichen Umfeld.

Die Daten der neu aufgenommenen Patienten weisen darauf hin, dass ein beträchtlicher Anteil der Kolonisationen durch *Enterobacteriaceae* mit Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen in madagassischen Krankenhäusern nicht durch nosokomiale Transmission verursacht, sondern endogenen Ursprungs ist. Dies könnte Einfluss auf die Erfolgsrate hygienischer Präventionsmaßnahmen zur Vorbeugung von Infektionen durch resistente Bakterien haben.

Unter den ESBL-positiven *Enterobacteriaceae* konnte das *bla_{CTX-M}*-Gen als häufiges genetisches Korrelat identifiziert werden. Tatsächlich waren alle ESBL-positiven Isolate der Studenten und Mitarbeiter des Gesundheitswesens *bla_{CTX-M}*-positiv. Bei vier von 11 ESBL-positiven Isolaten der Patientengruppe zeigte sich ebenfalls der *bla_{CTX-M}*-Genotyp. Diese Ergebnisse passen zu früheren Studien, bei denen der *bla_{CTX-M}*-Genotyp bei 75.5 % aller isolierten ESBL-positiven *Enterobacteriaceae* in Antananarivo nachgewiesen werden konnte [Rakotonirina et al. 2013]. Ferner konnte der AmpC-Resistenzmechanismus als ursächlich für einen größeren Anteil der Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen identifiziert werden. Diese vorläufigen Ergebnisse sind von Relevanz für das antimikrobielle Management, da Ceftriaxon als Mittel der Wahl für die kalkulierte Antibiotika-Therapie bei septischen Patienten in der Universitätsklinik in Antananarivo eingesetzt wird. Leider ist eine mikrobiologische Routinediagnostik selbst bei lebensbedrohlichen Infektionen für die Mehrheit der Patienten aufgrund mangelnder Ressourcen vor Ort nicht möglich.

Ein relevanter Anteil von 30 % (15 von 50 Stämmen) der *Enterobacteriaceae* mit Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen war multiresistent, was die Therapieoptionen noch weiter reduziert. Im Gegensatz zur häufig beobachteten Resistenz gegenüber Fluorchinolonen konnte eine Resistenz gegenüber Carbapenemen nur bei einem *Enterobacteriaceae*-Isolat, einem *Pantoea agglomerans* Stamm, festgestellt werden. Für die Carbapenemresistenz bei festgestelltem ESBL-Phänotyp und negativer Hyplex-SuperBug-ID-PCR könnte in diesem Fall ein Porin-Verlust in Kombination mit dem ESBL-Mechanismus ursächlich sein, dies bleibt jedoch letztlich spekulativ. Im Gegensatz dazu ließ sich bei 3 von 14 kolonisierenden, gram-negativen Nonfermentern, darunter 2 *Pseudomonas* spp., *bla_{OXA-48}* als Ursache der phänotypischen Carbapenemresistenz molekular nachweisen.

Zusätzlich konnte die Studie die hohe Transport- und Lagerungsstabilität der nachgewiesenen gram-negativen Erreger zeigen. Dies vereinfacht zukünftige epidemiologische Studien in Regionen mit eingeschränkten diagnostischen Möglichkeiten durch Transport der Proben auch in weiter entfernte Labore mit geeigneter technischer und personeller Ausstattung.

2.5 Ausblick

In dieser Studie konnten große Unterschiede bezüglich der Kolonisationsraten mit ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* sowie der Besiedlung mit Stämmen mit Resistenz gegen mindestens 3 der 4 getesteten bakteriziden Antibiotikagruppen zwischen beiden Studienkollektiven aufgezeigt werden. So waren 0,3 % der Studienteilnehmer der Kohorte mit Studenten und Arbeitnehmern im Gesundheitssystem aber 7,1 % der Teilnehmer aus der Patientengruppe kolonisiert. Es ist in zukünftigen Studien zu zeigen, ob sich dieser Unterschied reproduzieren lässt

und wo mögliche Ursachen für diese Diskrepanz zu suchen sind. Auch konnten wir zeigen, dass gram-negative Bakterien auch unter sehr eingeschränkten logistischen Voraussetzungen im tropischen Umfeld eine hohe Transport- und Lagerungsstabilität aufweisen. Es ist in weiteren Arbeiten zu prüfen, inwiefern dies ein spezies- oder gruppenspezifisches Phänomen darstellt.

Multiresistente *Enterobacteriaceae* rücken auch im ressourcenlimitierenden tropischen Umfeld immer mehr in den Fokus des klinischen Alltags und beeinflussen durch assoziierte Infektionen mit fehlendem Ansprechen auf die kalkulierte Antibiotikaapplikation den Erfolg der Therapie. Für viele Maßnahmen zum infektiologischen und hygienischen Management von Patienten mit solchen Erregern liegt jedoch eine noch eingeschränkte Evidenz zugrunde. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist zur Sicherstellung der notwendigen Evidenz erforderlich, um Hygienemaßnahmen und infektiologische Interventionen im klinischen Umfeld auch im tropischen ressourcenlimitierten Umfeld zu begründen und zu spezifizieren.

3. Zusammenfassung

3.1. Deutsche Zusammenfassung

In unserer Studie untersuchten wir die Prävalenz ESBL-bildender *Enterobacteriaceae* in der Nasenflora bei einer Kohorte von Studenten und Arbeitnehmern im Gesundheitssystem, sowie bei Patienten vor stationärer Aufnahme. Dabei wurden Nasenabstriche von 1541 Studenten und Arbeitnehmern im Gesundheitssystem, sowie bei 169 Patienten der infektiologischen Station des Universitätsklinikums Joseph Raseta de Befelatanana in Antananarivo, Madagaskar, entnommen und mittels kultureller und zum Teil molekularen Methoden untersucht. Zur Risikofaktoranalyse wurden Fragebögen zur Person, Umfeld und Tätigkeitsfeld an die Studienteilnehmer ausgehändigt und ausgewertet.

Der Nachweis ESBL-bildender *Enterobacteriaceae* in den Abstrichen wurde nach kultureller Anzucht auf Brilliance-ESBL-Agar mittels E-Testen und ABCD-Testen, sowie molekulargenetisch via kommerzieller Hyplex-ESBL- und Super-Bug-ID-PCR durchgeführt. Die Speziesidentifizierung erfolgte durch 16S-rRNA-Gensequenzierung und MALDI-TOF-MS Analysen.

Bezüglich der Kolonisation mit ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* und Stämmen mit Resistenz gegen mindestens 3 der 4 getesteten bakteriziden Antibiotika konnten in der Kohorte mit den Studenten und Arbeitnehmern im Gesundheitssystem bei fünf aus 1541 Teilnehmern (0,3 %) nasale Kolonisation nachgewiesen werden. In der Patientengruppe lag die Kolonisationsrate hingegen bei 7,1 %, hier waren 12 von 169 Teilnehmer betroffen. Es konnte keine Verringerung der Nachweisrate nach Lagerung der Proben und internationalen Transport im Vergleich zur bakteriellen Anzucht vor Ort festgestellt werden, wenn nach Probeneingang in Deutschland eine Bouillonanreicherung durchgeführt wurde. Weiterhin konnte in der Patientengruppe

gezeigt werden, dass Teilnehmer aus der Umgebung von Antananarivo seltener kolonisiert waren als im ländlicheren Umfeld. Auch waren jüngere Patienten insgesamt häufiger kolonisiert.

Es wurde festgestellt, dass ein erheblicher Anteil von Patienten mit *Enterobacteriaceae* besiedelt sind, die eine Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen aufwiesen, was ein Risiko von vor Ort schwierig zu therapierenden endogenen Infektionen birgt. Die nasale Kolonisation Studenten und Arbeitnehmer waren mit 0,3 % nur geringfügig. Die in der Studie gezeigte Transportstabilität von *Enterobacteriaceae* könnte zukünftig die Durchführung von weiteren Studien im ressourcenlimitierten tropischen Umfeld erleichtern.

3.2 Englische Zusammenfassung

This study investigates the nasal colonization with β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* both in patients in a hospital department of infectious diseases at admission and in healthy Madagascan students and health care workers. 1541 nasal swabs from students and health care workers and 169 nasal swabs from patients were obtained in Antananarivo, Madagascar, and transferred to Germany. Screening for β -lactamase (ESBL, AmpC) producing *Enterobacteriaceae* was performed by cultural and molecular methods, comprising Brilliance-ESBL-agar, E-testing, ABCD-testing, and commercial Hyplex-ESBL- and SuperBug-ID-PCR. All volunteers were asked to complete questionnaires to provide personal information. Regarding ESBL-positive strains and strains with resistance against at least three out of the four tested bactericidal antibiotic drugs, 0.3% (five out of 1541) of the students and health care workers showed nasal colonization, whereas colonization was observed in 7.1% (12 out of 169) of the hospitalized patients at admission. No appreciably reduced detection rates after sample storage and intercontinental transport were observed. The risk factor analysis showed that study participants of the patients group which were resident in Antananarivo were less frequently colonized than patients from the surrounding rural areas. Further, colonized patients were significantly younger.

A considerable proportion of nasal colonization with *Enterobacteriaceae* with resistance against 3rd generation cephalosporins was demonstrated in Madagascan hospital patients at admission, posing a risk of developing future endogenous infections. The nasal colonization of healthy individuals was negligible. Good storage and transport stability of *Enterobacteriaceae* will allow for future studies even in areas difficult to access in the tropics.

4. Abkürzungsverzeichnis

MRSA	Methicillin-resistent Staphylococcus aureus
ESBL	Extended spectrum beta-lactamase
VRE	Vancomycin-resistent Enterococcus
TM	Trademark
MALDI–TOF–MS	Matrix-assisted laser-desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
rRNA	ribosomal ribonucleic acid.
PCR	polymerase chain reaction
ID	identification
sp.	species
ssp.	species pluralis
bzw.	beziehungsweise
Ltd.	Limited
GB	Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
z.B.	zum Beispiel

5. Literaturverzeichnis

Ambler RP (1980) The structure of β -lactamases. Philos Trans R Soc London Series B Biol Sci. 16;289(1036):321-331.

Andriatahina T, Randrianirina F, Hariniana ER, Talarmin A, Raobijaona H, Buisson Y, Richard V (2010) High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric unit in Madagascar. BMC Infect Dis 10:204.

Arias CA, Murray BE (2009) Antibiotic-resistant bugs in the 21st century - a clinical super-challenge. N Engl J Med 360(5):439-443.

Barthélémy M, Péduzzi J, Yaghlane HB, Labia, R (1988) Single amino acid substitution between SHV-1 β -lactamase and cefotaxime-hydrolyzing SHV-2 enzyme. FEBS Lett. 231(1):217–220.

Bicudo EL, Macedo VO, Carrara MA, Castro FF, Rage RI (2007) Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* in a pediatric urgent care center. Braz J Infect Dis 11(2):281–284.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros A (1995) A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 39(6):1211–1233.

Bush K, Mobashery S (1998) How β -lactamases have driven pharmaceutical drug discovery. In: Resolving the Antibiotic Paradox. Rosen BP, Mobashery S, Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 456, Springer, Boston, MA, 71-98.

Bush K, Jacoby G, Palzkill T, Beta-lactamases Database, [Online im Internet] URL: <http://www.lahey.org/studies/webt.asp>, 10.03.2018, 14.00.

Choi SH, Lee JE, Park SJ, Choi SH, Lee SO, Jeong JY, Kim MN, Woo JH, Kim YS (2008) Emergence of antibiotic resistance during therapy for infections caused by Enterobacteriaceae producing AmpC beta-lactamase: implications for antibiotic use. Antimicrob Agents Chemother. 52(3):995-1000.

Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, Ramphal R, Wagener MM, Miyashiro DK, Yu VL (1991) Enterobacter Bacteremia: Clinical Features and Emergence of Antibiotic Resistance during Therapy. Ann Intern Med. 115(8):585–590.

Cilia V, Lafay B, Christen R (1996) Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences and their effect on phylogenetic analyses at the species level. Mol Biol Evol 13(3):451–461.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing. Approved standard MM18-A, 1st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 30–34.

Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH (2007) *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. J Clin Microbiol 45(6):1989–1992.

Delétoile A, Decré D, Courant S, Passet V, Audo J, Grimont P, Arlet G, Brisse S (2009) Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. J Clin Microbiol 47(2):300–310.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2014) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, [Online im Internet] URL: <http://www.eucast.org>. 05.06.2014, 15.00.

Farida H, Severin JA, Gasem MH, Keuter M, van den Broek P, Hermans PW, Wahyono H, Verbrugh HA (2013) Nasopharyngeal carriage of *Klebsiella pneumoniae* and other gram-negative bacilli in pneumonia-prone age groups in Semarang, Indonesia. J Clin Microbiol 51(5):1614-1616.

Friedmann R, Raveh D, Zartzer E, Rudensky B, Broide E, Attias D, Yinnon AM (2009) Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing enterobacteriaceae among patients during hospitalization. Infect Control Hosp Epidemiol 30(6):534–542.

Frickmann H, Christner M, Donat M, Berger A, Essig A, Podbielski A, Hagen RM, Poppert S (2013) Rapid discrimination of *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, and *H. haemolyticus* by fluorescence in situ hybridization (FISH) and two matrix-

assisted laser-desorption-ionization time of-flight mass spectrometry (MALDI–TOF–MS) platforms. PLoS One 8(4):e63222.

Herindrainy P, Randrianirina F, Ratovoson R, Ratsima Hariniana E, Buisson Y, Genel N, Decré D, Arlet G, Talarmin A, Richard V (2011) Rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in community settings in Madagascar. PLoS One 6(7):e22738.

Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Guisset A, Glupczinsky Y (2010) Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 48(6):2091–2096.

Huovinen P, Huovinen S, Jacoby GA (1988) Sequence of PSE-2 beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 32(1):134–136.

Inagaki K, Lucar J, Blackshear C, Hobbs CV (2019) Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus bacteremia - Nationwide Estimates of 30-day Readmission, In-hospital Mortality, Length of Stay, and Cost in the US. Clin Infect Dis ePub.

Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ (2011) Comparison of methods for AmpC betalactamase detection in Enterobacteriaceae. J Med Microbiol 60(Pt 6):715–721.

Jacoby GA, Medeiros AA (1991) More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 35(9):1697–1704.

Justesen US, Skov MN, Knudsen E, Holt HM, Sogaard P, Justesen T (2010) 16S rRNA gene sequencing in routine identification of anaerobic bacteria isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol* 48(3):946–948.

Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann SG (2012) Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae by a commercial multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 50(9):3115–3118.

Kazmierczak A, Cordin X, Duez JM, Siebor E, Pechinot A, Sirot J (1990) Differences between clavulanic acid and sulbactam in induction and inhibition of cephalosporinases in enterobacteria. *J Int Med Res.* 18(Suppl. 4):67D-77D.

Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B (1985) Evolution of plasmid-coded resistance to broadspectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 28(2):302–307.

Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S (1983) Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 11(6):315–317.

Liberto MC, Matera G, Puccio R, Lo Russo T, Colosimo E, Focà E (2009) Six cases of sepsis caused by *Pantoea agglomerans* in a teaching hospital. *New Microbiol.* 32:119–123.

Livermore DM (1987) Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol.* 6(4):439-445.

Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT, Bosso JA (2010) Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(1):109-115.

Mattner F, Bange FC, Meyer E, Seifert H, Wichelhaus TA, Chaberny IF (2012) Preventing the spread of multidrug-resistant gram-negative pathogens: recommendations of an expert panel of the German Society for Hygiene and Microbiology. *Dtsch Arztebl Int.* 109(3):39–45.

Medeiros AA (1997) Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis.* 24(Suppl. 1):19-45.

Melzer M, Petersen I (2007) Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J Infect.* 55(3):254-259.

Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W, Thomson KS (2006)

Prevalence of newer beta-lactamases in Gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. *J Clin Microbiol.* 44(9):3318–3324.

Murk JLAN, Heddema ER, Hess DLJ, Boogards JA, Vandenbroucke-Grauls CM, Debets-Ossenkopp YJ (2009) Enrichment broth improved detection of extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria in throat and rectal surveillance cultures of samples from patients in intensive care units. *J Clin Microbiol.* 47(6):1885-1887.

Nieminen O, Korppi M, Helminen M (2017) Healthcare costs doubled when children had urinary tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria. *Acta Paediatr.* 106(2):327–333.

Ongut G, Daloglu AE, Bayson BO, Daglar D, Ogunc D, Sekercioglu AO, Colak D, Gunseren F (2014) Evaluation of a chromogenic medium for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Lab.* 60(7):1213–1215.

Pitout JD, Hossain A, Hanson ND (2004) Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 42(12):5715–572.

Randrianirina F, Vaillant L, Ramarokoto CE, Adriamanarivo ML, Razafimahandry HC, Randiranomenjanahary J, Raveloson JR, Hariniana ER, Carod JF, Talarmin A,

Richard V (2010) Antimicrobial resistance in pathogens causing nosocomial infections in surgery and intensive care units of two hospitals in Antananarivo, Madagascar. *J Infect Dev Countries*. 4(2):74–82.

Rakotonirina HC, Garin B, Randrianirina F, Richard V, Talarmin A, Arlet G (2013) Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Antananarivo, Madagascar. *BMC Microbiol*. 13:85.

Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A (1999) The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg Infect Dis*. 5(1):9–17.

Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A, Limbago B, Fridkin S, National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities (2013) Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 34(1):1-14.

Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R (1987) Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 20(3):323–334.

Sougakoff W, Goussard S, Courvalin P (1988) The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol Lett.* 56(3):343–348.

Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ (2000) CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents.* 14(2):137-142.

Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A (2013) Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev.* 26(4):744–758.

6. Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde am Fachbereich Tropenmedizin des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg am Bernhard-Nocht-Institut Hamburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. J. May, Herrn PD. Dr. Ralf Matthias Hagen sowie Herrn PD Dr. Hagen Frickmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. J. May, PD Dr. Ralf Hagen und PD Dr. Hagen Frickmann mit Unterstützung unserer madagassischen Kollegen bezüglich der praktischen Umsetzung und Durchführung vor Ort.

Die Akquise der Studienteilnehmer, die Probenentnahme und das Interview mit Fragebögen erfolgten durch unsere madagassischen Kollegen, Dr. Benedikt Hogan und mich persönlich.

Die kulturelle und molekularbiologische Analyse der Patientenproben erfolgte mit fachlicher Unterstützung durch die o.g. Betreuer sowie die Mitarbeiter(innen) des Fachbereichs Tropenmedizin Annett Michel und Steffen Lohr durch mich persönlich.

Die Erfassung der Daten der mikrobiologischen Ergebnisse und der Informationen aus den Fragebögen, sowie das Pflegen der Daten erfolgte ausschließlich durch mich persönlich. Die statistische Auswertung der Fragebögen erfolgte mit Unterstützung durch PD Dr. Hagen Frickmann.

An dem verfassten Artikel hatte ich als Erstautor einen wesentlichen Anteil.

Ich versichere keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

7. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mir diese Promotionsarbeit ermöglicht haben.

Ich bedanke mich bei unseren madagassischen Kollegen der Infektiologie der Universitätsklinik Hospital Joseph Raseta de Befelatanana in Antananarivo, allen voran Dr. Rvivo Andry Rakotoarivelo und Fetra Razafimanatsoa. Mit viel Engagement haben sie den Erfolg dieser Promotion ermöglicht und waren stets bemüht Sprachbarrieren zu minimieren.

Zudem bedanke ich mich bei Prof. Dr. May sowie den Mitarbeitern aus der Abteilung Infektionsepidemiologie für die reibungslose Zusammenarbeit und vor allem bei Dr. Benedikt Hogan für die logistische Unterstützung in Madagaskar.

Für die flexible und geduldige Unterstützung im Heimatlabor geht ein herzliches Dankeschön vor allem an Annett Michel und die anderen Kollegen der Abteilung.

Für die Überlassung des Themas und Betreuung geht mein besonderer Dank an Herrn PD Dr. med. Ralf Matthias Hagen, Abteilung XXI, Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn PD. Dr. med. Hagen Frickmann, Klinik XXI Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Außenstelle BNITM, Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, der mich zu jeder Zeit hervorragend betreut hat, immer für Fragen zur Verfügung stand und durch seine zu jeder Zeit vorhandene prompte Hilfe die Fertigstellung der Promotion möglich gemacht hat.

Ohne diese zahlreiche Unterstützung wäre diese Promotionsarbeit nicht zustande gekommen.

8. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: