

Autorin: Dr. Claudia Bagutti

Nachweis von Antibiotikaresistenzen in Staphylokokken aus Weichkäse

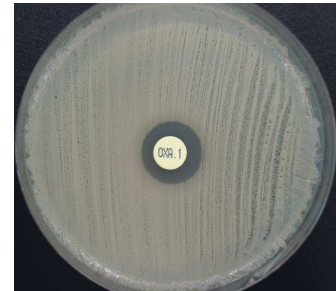
Anzahl untersuchter Weichkäseproben: 13

Anteil antibiotikaresistenter Koagulase-pos. Staphylokokken Isolate: 3 von 4

Anteil antibiotikaresistenter Koagulase-neg. Staphylokokken Isolate: 21 von 22

Ausgangslage

Multiresistente Bakterien sind gleichzeitig gegen mehrere Antibiotika unempfindlich und wurden in den letzten Jahren auch in der breiten Öffentlichkeit bekannt. Multiresistente *S. aureus* (MRSA), NDM-1¹ Enterobakterien, die praktisch gegen alle bekannten Antibiotika resistent sind, sowie diesen Sommer Darmbakterien vom Typ *E.coli* EHEC O104:H4, die ebenfalls mehrere Resistenzgene aufweisen. Die Zunahme von multiresistenten, aber auch der Einzelresistenzen aufweisenden Bakterien ist auf den übermässigen Einsatz von Antibiotika in der Human- wie auch in der Tiermedizin sowie in der Lebensmittelproduktion (Tierhaltung, Aquakulturen) in den letzten 50 Jahren zurückzuführen. Die Resistenzbildung wurde durch die Eigenschaft der Bakterien begünstigt, Gene - wie Antibiotikaresistenzgene - durch horizontalen Gentransfer gegenseitig weitergeben zu können. Studien haben gezeigt, dass die Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen auch bei Bakterien der menschlichen Flora, die mit antibiotikaresistenten Bakterien in Kontakt kommen², vorkommt.



Untersuchungsziel

Mit der vorliegenden Studie wurde das Auftreten von Antibiotikaresistenzen in Staphylokokken aus Weichkäse untersucht. Die Isolate wurden auf Resistenzen analysiert, welche in Staphylokokken aus Nutztieren wiederholt nachgewiesen wurden³.

Gesetzliche Grundlagen

Bisher gibt es in der Schweiz und der EU keine gesetzlichen Vorgaben für das Auftreten von Antibiotikaresistenzen in Lebensmitteln. Die EU (European Food Safety Authority, EFSA) erklärte 2001 die Verringerung der Verwendung von Antibiotika und das Überwachen von Antibiotikaresistenzen in Lebensmittel-assoziierten Bakterien zum Ziel einer Strategie zur Erhöhung der Lebensmittelsicherheit.

Probenbeschreibung

Dreizehn Weichkäse mit geschmierter Rinde, wie sie z.B. in Münster, Taleggio, Chaumes und Vacherin zu finden ist, wurden im Rahmen dieser Untersuchungskampagne erhoben und gemäss Hygieneverordnung des Lebensmittelgesetzes⁴ untersucht. Homogenate aus genussfertiger Rinde und Käseteig (entsprechend ihren Anteilen im Verhältnis 10 % Rinde und 90 % Teig berücksichtigt) jeder Probe wurden quantitativ auf Koagulase-positive Staphylokokken und *E. coli* untersucht. Die Resultate entsprachen den gültigen Vorschriften. Zusätzlich wurden bei Wachstum auf dem für die Staphylokokken eingesetztem Nährmedium je zwei Staphylokokken Isolate gewonnen: wenn möglich jeweils eine Koagulase-positive (KPS) und eine Koagulase-negative Staphylokokkenart (KNS), andernfalls je nach Verfügbarkeit zwei KPS oder KNS. Insgesamt wurden vier KPS und 22 KNS isoliert und untersucht. Folgende Spezies wurden in den 26 Isolaten identifiziert:

¹Kumarasamy, K. K. et al. (2010). Lancet Infect Dis 10(9): 597-602.

²Salyers, A. A. et al. (2004). Trends Microbiol 12(9): 412-416; Sorum, H. and T. M. L'Abée-Lund (2002). Int J Food Microbiol 78(1-2): 43-56.

³Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2008). "Antibiotikaresistenzatlas "Germap 2008". 1. Auflage. BVL, Berlin.

⁴Hygieneverordnung des EDI (HyV; SR 817.024.1); Bundesgesetz vom 9.10.1992 über Lebensmittel und Gebrauchsgegenstände (Lebensmittelgesetz, LMG; SR 817.0)

Koagulase-positive Staphylokokken (KPS)	Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)	
<i>S. aureus</i> (2)	<i>S. equorum</i> (1)	<i>S. saprophyticus</i> (3)
<i>S. delphini/intermedius/pseudintermedius</i> [#] (1)	<i>S. hominis</i> (1)	<i>S. vitulinus</i> (7)
<i>S. hyicus</i> * (1)	<i>S. lentus</i> (2)	<i>S. xylosus</i> (6)
	<i>S. lugdunensis</i> (2)	

* *S. hyicus* (koagulasevariabel), [#] als *S. delphini*, *S. intermedius* oder *S. pseudointermedius* (KPS) identifiziert.

Staphylococcus aureus und KNS wie *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. lugdunensis* und *S. saprophyticus* sind zumeist als natürliche Besiedler der menschlichen Haut und Schleimhäute opportunistische Pathogene, d.h. sie führen in gewissen Fällen von Immunschwäche zu Infektionen. Die Arten *S. vitulinus*, *S. equorum*, *S. hyicus*, *S. lentus* und Arten der *S. intermedius*-Gruppe sind vorwiegend tierische Keime und werden häufig aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs wie z.B. der Milch isoliert. Einige Arten wie *S. xylosus*, *S. saprophyticus* und *S. equorum* werden in den Weichkäsen mit Schmiere bewusst zur Behandlung der Oberfläche eingesetzt und sind neben Hefen, Schimmelpilzen und anderen Bakterienarten Bestandteil der Schmiereflora.

Prüfverfahren

Aufarbeitung der Lebensmittel und Isolieren der Staphylokokken erfolgte gemäss Schweizerischem Lebensmittelbuch oder äquivalenter validierter Methoden. Die auf Baird-Parker (mit RPF-Suppl.) Selektivagar isolierten Staphylokokken wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie auf Spezies- bzw. in einem Fall auf Gruppenebene identifiziert.

Agardiffusionstest (Disk-Assay): Die Untersuchungen und Beurteilungen erfolgten gemäss SOP529 und nach den Richtlinien NCCLS⁵. Jedes zu untersuchende Bakterienisolat wurde als homogener Rasen auf einer Agarplatte ausgesät. Darauf wurden Papierblättchen (Disks), die mit einem Antibiotikum imprägniert sind, aufgelegt und bebrütet. Die Grösse des Disk-Hemmhofs ist ausschlaggebend für die Empfindlichkeit oder Resistenz. Es wurde auf folgende Antibiotika getestet.

Verwendete Antibiotika bzw. mit den entsprechenden Antibiotika imprägnierte Disks (Abkürzung)			
Ampicillin (AMP)	Ciprofloxacin (CIP)	Clindamycin (CLI)	Erythromycin (ERY)
Oxacillin (OXA)	Penicillin (PEN)	Tetracyclin (TET)	Trimethoprim (TMP)

Reihenverdünnungstest (Microdilution-Assay): Die Untersuchungen und Beurteilungen erfolgten gemäss SOP530 und nach den Richtlinien NCCLS⁵. Jedes Bakterienisolat wurde seriell in Flüssigmedium geimpft, welches das entsprechende Antibiotikum in abgestuften Konzentrationen enthielt. Die kleinste Konzentration, bei der kein Wachstum mehr erfolgt (Minimale Hemmkonzentration) ist ausschlaggebend für die Empfindlichkeit oder Resistenz. Es wurde das gleiche Antibiotikaspektrum verwendet wie beim Disk-Assay.

Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen mittels DNA-Microarray: Von einzelnen Isolaten wurde die DNA isoliert. Die DNA wurde mit der Methode von V. Perreten (Universität Bern) auf das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen untersucht⁶.

Induzierter β -Lactamasetest (Nitrocefin-Test⁷): Zur Bestätigung der Penicillin-Empfindlichkeit wurde bei einzelnen Isolaten mit Kolonien vom OXA-Disk Zonenrand der chromogene Cephalosporin β -Lactamasetest durchgeführt.

Induzierter Penicillin-Binding-Protein (PBP2') Latex Agglutinationstest⁸: Zur Bestätigung der OXA-Resistenz wurde bei einzelnen Isolaten mit Kolonien vom OXA-Disk Zonenrand die Produktion des *mecA* Genprodukts PBP2' mittels Antikörpertest überprüft.

⁵Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test: M100-S21" Vol. 30 des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, Wayne, Pa.).

⁶Perreten, V. et al. (2005). J Clin Microbiol 43(5): 2291-2302.

⁷O'Callaghan, C. H. et al. (1972). Antimicrob. Agents Chemother. 1(4): 283-288.

⁸Hussain, Z. et al. (2000). J Clin Microbiol 38(6): 2051-2054.

Ergebnisse

Unter den 26 Staphylokokken Isolaten wurden 24 Antibiotikaresistente gefunden (siehe Tabelle unten). Bei den antibiotikaempfindlichen Isolaten handelte es sich um je eine KPS und eine KNS Art. Unter den 24 antibiotikaresistenten Isolaten wurden in 11 Fällen Einzelresistenzen identifiziert. Vier Isolate wiesen multiple Resistenzen auf:

- Bei beiden *S. aureus* Isolaten (EX110586/1 und /2) wurden die β -Lactam-Resistenzen AMP und PEN (phänotypisch) und Resistenzen gegen ERY, CLI, TET und OXA (phänotypisch und genotypisch) nachgewiesen.
- In zwei *S. vitulinus* Isolaten (EX110733/1 und /2) wurde bis auf die TET Resistenz das gleiche AB-Resistenzprofil wie bei den *S. aureus* Isolaten gefunden. Das Isolat EX110733/2 wies phänotypisch ausserdem eine TMP Resistenz auf.

Isolat-nummer	Spezies des Isolats	Phänotypische Resistenz	Genotypische Resistenz		Folgerung* Resistenz gg.
			Resistenzgene	Resistenz gg.	
EX110300/1	<i>S.lugdunensis</i>	CIP, PEN	nd [‡]	na [‡]	CIP, β -Lactam [#]
EX110300/2	<i>S.del/int/pseudoint</i>	-	-	-	-
EX110305/1	<i>S.xylosus</i>	TET	tetK	TET	TET
EX110305/2	<i>S.vitulinus</i>	TMP	-	-	TMP
EX110306/1	<i>S.xylosus</i>	TET	tetK	TET	TET
EX110306/2					
EX110582/1	<i>S.hominis</i>	-	nd	na	β -Lactam
EX110582/2	<i>S.vitulinus</i>	TMP	-	-	TMP
EX110583/1	<i>S.saprophyticus</i>	OXA	-	-	OXA, β -Lactame
EX110583/2	<i>S.hyicus</i>	OXA	mphC	Macrolide [§]	Macrolide, OXA, β -Lactame
EX110584/1	<i>S.lugdunensis</i>	AMP, PEN	mphC, blaZ	Macrolide, β -Lactame	Macrolide, AMP, PEN
EX110584/2	<i>S.saprophyticus</i>	AMP, PEN	mphC, blaZ	Macrolide, β -Lactame	OXA, Macrolide, AMP, PEN
EX110585/1	<i>S.vitulinus</i>	TMP	-	-	TMP
EX110585/2					
EX110586/1	<i>S.aureus</i>	AMP, CLI, ERY, PEN, OXA, TET	ermB, mecA, tetL	MLS [¶] , OXA, TET	AMP, CLI, ERY, PEN, OXA, TET
EX110586/2					
EX110587/1	<i>S.xylosus</i>	TET	tetK	TET	TET
EX110587/2					
EX110589/1	<i>S.vitulinus</i>	ERY, TMP	ermB	MLS	ERY, TMP
EX110589/2	<i>S.saprophyticus</i>	-	-	-	-
EX110730/1	<i>S.lentus</i>	ERY	mphC	Macrolide	ERY
EX110730/2	<i>S.lentus</i>	ERY, OXA	mphC, mecA	Macrolide, OXA	ERY, OXA, PEN
EX110733/1	<i>S.vitulinus</i>	AMP, CLI, ERY, PEN, OXA	ermF/G/DJK, mecA	MLS, OXA	AMP, CLI, ERY, PEN, OXA
EX110733/2	<i>S.vitulinus</i>	AMP, CLI, ERY, PEN, OXA, TMP	ermF/G/DJK, mecA	MLS, OXA	AMP, CLI, ERY, PEN, OXA, TMP
EX110735/1	<i>S.xylosus</i>	AMP, PEN	nd	nd	AMP, PEN
EX110735/2	<i>S.eqorum</i>	ERY, OXA	ermDJK	Macrolide	ERY, OXA, PEN

* Die Folgerung aus phänotypischen und genotypischen Assays sowie Nitrocefin- und Latex-Agglutinationstests

‡ nd: nicht durchgeführt; na: nicht anwendbar

β -Lactame umfassen u.a. AMP, PEN

§ Macrolide umfassen u.a. ERY

¶ MLS (Macrolide, Lincosamide, Streptogramine) umfassen u.a. ERY, CLI

Schlussfolgerungen

- Aus den 13 Käseproben konnten vorwiegend KNS isoliert werden (22 KNS gg. 4 KPS), wobei in 10 Fällen die für Käse mit Schmierrinde typischen Staphylokokkenarten *S. xylosus*, *S. saprophyticus* und *S. equorum* identifiziert wurden.
- Es ist bekannt, dass die meisten Staphylokokken resistent gegen PEN sind. Die PEN-Resistenz wurde auch in den hier beschriebenen Käseisolaten als die häufigste Resistenz ermittelt:

Staphylokokken-Gruppe	Häufigkeit der Resistenz gg. (Prozent)							
	AMP [‡]	CIP	CLI	ERY [§]	OXA	PEN [‡]	TET	TMP
KPS (n = 4)*	75	0	50	75	75	75	50	0
KNS (n = 22)	32	5	9	36	27	50	23	27

* Aufgrund der kleinen Fallzahl bei den KPS ist die Aussagekraft der Resistenzhäufigkeit aus statistischen Gründen limitiert.

[‡]inkl. Resistenz gg. β -Lactame

[§]inkl. Resistenz gg. ERY

- Nicht in allen Fällen konnte die phänotypische Resistenz durch den Nachweis des entsprechenden Resistenzgens mittels DNA-Microarray bestätigt werden. Bei sieben Isolaten fehlte jeweils der Gennachweis für eine festgestellte Resistenz (OXA 3x, TMP 4x). Falls die Resistenz nicht durch einen indirekten Mechanismus zustande kommt wie beispielsweise die Oxacillin-Resistenz in β -Lactamaseüberproduzenten (vgl. EX110583/1 und /2), ist dies meistens darin begründet, dass das verantwortliche Resistenzgen vom DNA-Microarray nicht erkannt wird. Dies ist z.B. beim Vorliegen einer Punktmutation (Austausch eines Nukleotids in der Gensequenz) möglich oder wenn es sich um eine neue, noch nicht in den DNA-Microarray integrierte Variante eines Gens handelt.
- Vier Isolate (zwei *S. aureus*, KPS und zwei *S. vitulinus*, KNS) wiesen eine Mehrfachresistenz auf. Alle Isolate tragen das *mecA*-Gen, was auf eine Multiresistenz schliessen lässt. Diese Isolate müssen als potentiell problematischer angesehen werden. Obwohl die Übertragung einer Multiresistenz über die Nahrungsaufnahme auf fakultativ pathogene Keime, und die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit diesem Keim, als eher gering einzustufen ist, wurden diese Zusammenhänge in Studien für möglich erachtet. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die multiresistenten Keime Teil der zur Behandlung der Käseoberfläche eingesetzten Schmierflora sind.
- Die Untersuchung von antibiotikaresistenten Bakterien aus Lebensmitteln werden wir in nächster Zukunft auf weitere Keime (u.a. Enterobakterien, Enterokokken) ausweiten.