

Nachweis von Antibiotikaresistenzen in Staphylokokken aus Lebensmitteln

Anzahl untersuchte *S. aureus* Isolate: 34, davon antibiotikaresistent 5

Anzahl untersuchte Koagulase-neg. Staphylokokken Isolate: 29, davon antibiotikaresistent 13

Ausgangslage

In der Human- wie auch der Tiermedizin, in der Landwirtschaft und bei Aquakulturen wurden in den letzten 50 Jahren zunehmend Antibiotika angewendet, was zu einer dramatischen Zunahme von Resistenzen bzw. Resistenzgenen in Bakterien geführt hat. Steigend ist speziell die Zahl derjenigen Bakterien, die gleichzeitig gegen mehrere Antibiotika unempfindlich und somit multiresistent sind. Bekannte Vertreter sind multiresistente *S. aureus* (MRSA) oder die kürzlich bekannt gewordenen NDM-1¹ Enterobakterien, die praktisch gegen alle bekannten Antibiotika resistent sind.

Resistente und empfindliche Bakterien werden vom Menschen auf verschiedene Weise aufgenommen, u.a. gelangen sie über die Nahrungsaufnahme in den Gastrointestinaltrakt. In Lebensmitteln wie Joghurt, Käse und gewissen Wurstwaren werden Bakterien im Herstellungsprozess absichtlich zugesetzt. Bei den meisten Lebensmitteln, die Bakterien enthalten, handelt es sich jedoch um eine Kontamination.

Studien haben gezeigt, dass die Exposition von Bakterien der menschlichen Flora gegenüber antibiotikaresistenten Bakterien zur Aufnahme von Antibiotikaresistenzgenen führen kann². Somit müssen antibiotikaresistente Bakterien enthaltende Lebensmittel als weiteres Reservoir von Resistenzgenen angesehen werden.

Untersuchungsziele

Mit der vorliegenden Studie wurde das Auftreten von Antibiotikaresistenzen in Lebensmittel-assoziierten Staphylokokken untersucht. Es wurde auf diejenigen Antibiotikaresistenzen analysiert, welche in Staphylokokken 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

Im Rahmen von Betriebshygienekontrollen und Kampagnen wurden Bakterienisolate aus Lebensmittelproben von Restaurations- und Lebensmittelbetrieben gesammelt. Bei den Lebensmitteln handelte es sich um vorgekochte Produkte (Reis, Teigwaren, Gemüse, Fleisch, Fisch) und genussfertige Produkte (Sandwiches mit Fleisch-, Wurst- und Käsezutaten).

Von 63 Proben wurden 34 *S. aureus* (Koagulase-positive, KPS) bzw. 29 Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) Isolate gewonnen und untersucht (Tabelle 1).

¹ Kumarasamy, K. K. et al. (2010). "Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study." *Lancet Infect Dis* 10(9): 597-602.

² Salyers, A. A. et al. (2004). "Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes." *Trends Microbiol* 12(9): 412-416, Sorum, H. and T. M. L'Abée-Lund (2002). "Antibiotic resistance in food-related bacteria--a result of interfering with the global web of bacterial genetics." *Int J Food Microbiol* 78(1-2): 43-56.

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

Tabelle 1: Spezies und Anzahl der analysierten Isolate

| Koagulase-positive Staphylokokken (KPS) | Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) | |
|---|---|-------------------------|
| <i>S. aureus</i> (34) | <i>S. epidermidis</i> (14) | <i>S. vitulinus</i> (2) |
| | <i>S. hominis</i> (2) | <i>S. warneri</i> (5) |
| | <i>S. saprophyticus</i> (1) | <i>S. xylosus</i> (3) |
| | <i>S. sciuri</i> (2) | |

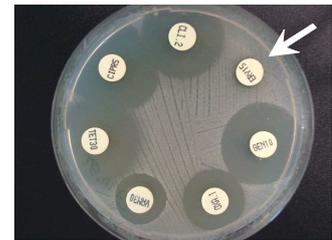
Staphylococcus aureus und KNS wie *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus* und *S. warneri* sind zumeist als natürliche Besiedler der menschlichen Haut und Schleimhäute opportunistische Pathogene, d.h. sie führen in gewissen Fällen von Immunschwäche zu Infektionen. Die Arten *S. sciuri* und *S. vitulinus* sind vorwiegend tierische Keime und werden häufig aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs isoliert. Einige Arten wie *S. xylosus* und *S. saprophyticus* werden auch als Fermentationskeime bei der Herstellung von gewissen Wurst- und Käsearten eingesetzt.

Prüfverfahren

Aufarbeitung der Lebensmittel und Isolieren der Staphylokokken erfolgte gemäss Schweizerischem Lebensmittelhandbuch oder äquivalenter validierter Methoden. Die auf Baird-Parker (mit RPF-Suppl.) Selektivagar isolierten Staphylokokken wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie auf Speziesebene identifiziert.

Agardiffusionstest (Disk-Assay)⁴

Jedes zu untersuchende Bakterienisolat wird als homogener Rasen auf einer Agarplatte ausgesät. Darauf werden Papierblättchen (Disks), die mit einer bestimmten Menge eines Antibiotikums imprägniert sind, aufgelegt und 18 -24 Std. bei 37°C bebrütet. Das Antibiotikum diffundiert in den Agar, und je nach Grad der Empfindlichkeit des Isolats erfolgt eine Unterdrückung des Wachstums in einem unterschiedlichen Bereich um das Disk (Hemmhof). Der Durchmesser des Hemmhofs gilt als Mass für die Beurteilung, ob der Bakterienstamm „resistent“ (gar kein Hemmhof oder Durchmesser kleiner als Referenzstamm⁴; Figur 1), „intermediär“ oder „empfindlich“ (Durchmesser gleich oder grösser als Referenzstamm) ist. Es wurden Disks mit den in Tabelle 2 aufgeführten Antibiotika verwendet.



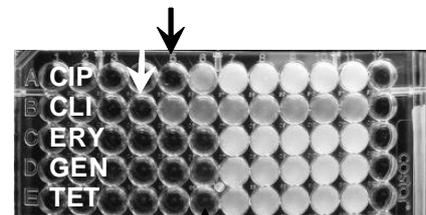
Figur 1: Beispiel eines Disk-Assays mit phänotypischer Resistenz auf Erythromycin (Pfeil: fehlender Hemmhof)

Tabelle 2: Verwendete Antibiotika bzw. mit entsprechendem Antibiotika imprägnierte Disks (Abkürzung)

| | | | |
|---------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| Ciprofloxacin (CIP) | Clindamycin (CLI) | Erythromycin (ERY) | Gentamicin (GEN) |
| Oxacillin (OXA) | Tetracyclin (TET) | Vancomycin (VAN) | |

Reihenverdünnungstest (Microdilution-Assay)⁴

Jedes Bakterienisolat wird seriell in Flüssigmedium geimpft, welches das entsprechende Antibiotikum in abgestuften Konzentrationen enthält. Die niedrigste Konzentration der Verdünnungsreihe, bei welcher der Bakterienstamm kein Wachstum zeigt, wird als „minimale Hemmstoffkonzentration“ (MHK) bezeichnet (Figur 2). Als „resistent“ gelten Isolate deren MHK über derjenigen für den Referenzstamm⁴ angegebenen liegt. Es wurde das gleiche Antibiotikaspektrum verwendet wie beim Disk-Assay (Tabelle 2).

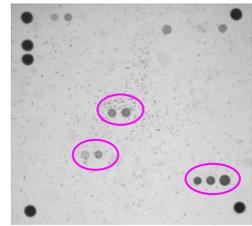


Figur 2: Beispiel eines MIC-Assays. Die Pfeile bezeichnen die Plattenvertiefung mit der jeweiligen minimale Hemmkonzentrationen.

⁴ Die Untersuchungen und Beurteilungen erfolgten gemäss CLSI-Richtlinien: NCCLS (2009). "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; Nineteenth Informational Supplement." M100-S19 Vol. 29. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen mittels DNA-Microarray.

Von den in den Sensitivitätstests als resistent erkannten Isolaten wurde die DNA isoliert. Die DNA wurde mit der Methode von V. Perreten (Universität Bern) auf das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen untersucht⁵.



Figur 3: Beispiel eines Microarrays. Bei den markierten Punkten handelt es sich um Nachweise von Resistenzgenen, bei den anderen um Kontrollen.

Nitrocefin-Test

Bei den *blaZ*-positiven Isolaten (Resistenzgen gegen Antibiotika des Typs β -Lactam) wurde zur Bestätigung der chromogene Cephalosporin β -Lactamasetest durchgeführt⁶.

Ergebnisse

Unter den 34 *S. aureus* Isolaten wurden fünf Antibiotikaresistente gefunden (Tabelle 3). Dabei handelte es sich jeweils um Einzelresistenzen: vier Erythromycin- und eine Gentamycin-Resistenz.

- Im Falle der Erythromycin-Resistenzen konnten diese sowohl mit beiden Empfindlichkeitstests als auch mit dem Gennachweis übereinstimmend detektiert werden.
- Die Gentamycin-Resistenz wurde nur phänotypisch nachgewiesen.

Tabelle 3: Nachweis von phänotypischer und genotypischer Antibiotikaresistenz in den isolierten Staphylokokken

| Probe-nummer | Spezies des Isolats | Phänotypische Resistenz | Genotypische Resistenz | | Nitrocefin-Test |
|--------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------------|--|-----------------|
| | | | Resistenzgene | Resistenz gg. | |
| PK090093 | <i>S. aureus</i> | ERY | <i>msr, blaZ</i> | ERY, β -Lactam* | nd ⁷ |
| PK090057 | <i>S. aureus</i> | GEN | - | - | nd |
| PK090047 | <i>S. aureus</i> | ERY | <i>msr, blaZ</i> | ERY, β -Lactam | nd |
| DB090245 | <i>S. aureus</i> | ERY | <i>msr, blaZ, dfrA</i> | ERY, β -Lactam, TmP ⁸ | nd |
| DB090115 | <i>S. aureus</i> | ERY | <i>msr, blaZ</i> | ERY, β -Lactam | nd |
| DB090517 | <i>S. epidermidis</i> | ERY | <i>msr, blaZ, dfrA</i> | ERY, β -Lactam, TmP | nd |
| PK090312 | <i>S. epidermidis</i> | ERY, TET, OXA | <i>mphC, tetK, mecA, blaZ</i> | ERY, TET, OXA, β -Lactam | nd |
| UG090376 | <i>S. epidermidis</i> | ERY | <i>dfrA</i> | TmP | nd |
| PK090292 | <i>S. saprophyticus</i> | OXA | - | - | negativ |
| PK090260 | <i>S. sciuri</i> | OXA | - | - | negativ |
| PK090264 | <i>S. sciuri</i> | OXA | - | - | negativ |
| DB090519 | <i>S. vitulinus</i> | OXA | - | - | positiv |
| DB090532 | <i>S. vitulinus</i> | ERY, TET, VAN | <i>msr, mphC, tetK, blaZ, dfrA</i> | ERY, TET, β -Lactam, TmP | nd |
| DB090515 | <i>S. warneri</i> | OXA | <i>blaZ</i> | β -Lactam | positiv |
| DB090531 | <i>S. warneri</i> | OXA | - | - | negativ |
| UG090374 | <i>S. warneri</i> | OXA | <i>blaZ</i> | β -Lactam | positiv |
| PK090309 | <i>S. xylosus</i> | OXA | <i>tetK</i> | TET | negativ |
| UG090389 | <i>S. xylosus</i> | ERY | <i>msr, blaZ, dfrA</i> | ERY, β -Lactam, TmP | nd |

* β -Lactam steht für: Typ Breitspektrum β -Lactame wie Penicillin

Unter den KNS wurde eine höhere Resistenzrate festgestellt: 13 von 29 Proben zeigten in einem oder mehreren der angewandten Tests Resistenzen gegen die geprüften Antibiotika (Tabelle 3):

- Drei *S. epidermidis* Isolate wiesen eine Erythromycin-Resistenz auf, wobei dies nur bei zwei Isolaten phänotypisch und genotypisch nachgewiesen werden konnte. Das *S. epidermidis* Isolat PK090312 wies ausserdem übereinstimmend Tetracyclin- und Oxacillin-Resistenzen auf. Der Microarray-Nachweis belegte zudem eine β -Lactam-Resistenz. Dieses Isolat muss als multiresistent betrachtet werden.

⁵ Perreten, V. et al. (2005). "Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria." J Clin Microbiol 43(5): 2291-2302.

⁶ O'Callaghan, C. H. et al. (1972). "Novel Method for Detection of β -Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate." Antimicrob. Agents Chemother. 1(4): 283-288.

⁷ nd: nicht durchgeführt

⁸ TmP: Trimethoprim

- In den zwei *S. xylosus* Isolaten wurde eine Erythromycin- (PK090309) bzw. eine Tetracyclin- und Oxacillin-Resistenz (UG090389) detektiert. Ausser im Fall von Oxacillin wurden die Resistenzen sowohl im phänotypischen als auch genotypischen Test nachgewiesen. PK090309 weist zudem Resistenzgene für eine β -Lactam- und Trimetroprim-Resistenz auf.
- Ein weiteres mehrfach resistentes Isolat wurde aus der Probe DB090532 (*S. vitulinus*) isoliert: In beiden Empfindlichkeitsnachweisen sowie im Microarray-Test wurde sowohl Erythromycin- als auch Tetracyclin-Resistenz nachgewiesen. Des weiteren zeigte jeweils einer der Nachweise eine Vancomycin-, β -Lactam und Trimetroprim-Resistenz auf.
- Bei sieben Isolaten (drei *S. warneri*, zwei *S. sciuri*, je ein *S. vitulinus* und *S. saprophyticus*) detektierten wir im Microdilution-Assay eine Oxacillin-Resistenz, aber ohne *mecA*-Gennachweis, jedoch zweimal positiv für das *blaZ*-Gen. Alle diese Stämme wurden deshalb mittels Nitrocefin-Test auf β -Lactamase-Überproduktion getestet, was bei den *blaZ*-positiven Isolaten DB090519 und UG090374 der Fall war.

Schlussfolgerungen

- In 18 der 63 untersuchten Staphylokokken Isolate wurden Antibiotikaresistenzen gefunden. Die Häufigkeit der Resistenz ist bei der Gruppe der KNS deutlich höher als bei *S. aureus* (Tabelle 4). Für die KNS liegen allerdings auch nur in den wenigsten Fällen eigene Konzentrationsstandards zur Festlegung der Resistenzen mittels phänotypischer Assays vor.

Tabelle 4: Häufigkeit der Resistenz gegenüber den getesteten Antibiotika (in Prozent)

| Staphylokokken-Gruppe | Häufigkeit der Resistenz gegenüber | | | | | | | |
|-----------------------|------------------------------------|-----|------|-----|------|------|-----|-----------------|
| | CIP | CLI | ERY | GEN | OXA | TET | VAN | β -Lactam |
| <i>S. aureus</i> | 0* | 0 | 11.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11.8 |
| KNS | 0 | 0 | 10.3 | 0 | 31.0 | 10.3 | 0 | 20.7 |

- In einigen Fällen konnte die phänotypische Resistenz nicht durch die Anwesenheit des entsprechenden Resistenzgens bestätigt werden. Dies wird auch in der Literatur beschrieben und kann mehrere Ursachen haben: das zugrundeliegende Gen wird vom Microarray nicht erkannt; es liegen Mischisolate vor; die Resistenz kommt aufgrund eines indirekten Mechanismus zustande (vgl. Oxacillin-Resistenz in β -Lactamaseüberproduzenten). In der vorliegenden Studie lagen die Übereinstimmungsraten für die Erythromycin- und Tetracyclin-Resistenzen bei 100 %. Für die Oxacillin-Resistenz betrug sie jedoch nur 11 % bzw. 44 % (unter Miteinbezug des Nitrocefin-Tests), was als niedrig bezeichnet werden muss.
- Zwei KNS Isolate wiesen übereinstimmend eine Mehrfachresistenz auf. Bei einem davon, welches *mecA*-positiv war, muss von einer Multiresistenz ausgegangen werden. 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.
- Die Untersuchung von antibiotikaresistenten Bakterien aus Lebensmitteln werden wir in nächster Zukunft auf weitere Keime ausweiten.

Danksagung

Wir danken Dr. Vincent Perreten (Institut für Veterinär Bakteriologie, Universität Bern) für die Einführung in das Microarray-Verfahren und die Möglichkeit, unsere Isolate testen zu können. Wir bedanken uns bei Dres. Hildegard Adler (Universitätsspital Basel) und Leo Meile (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ernährung, Universität Zürich) für wertvolle Diskussionen.