

Nachweis von Antibiotika-resistenten Staphylokokken in Weichkäse

Masterarbeit am Labor für Lebensmitteltechnologie der ETH Zürich in Zusammenarbeit mit dem Kantonalen Labor Basel-Stadt.

Anzahl untersuchte Weichkäse: 31

Antibiotikaresistente Isolate: 6

Ausgangslage / Untersuchungsziele

Insbesondere gegen mehrere Antibiotika multiresistente Keime sind in den letzten Jahren vermehrt im Fokus, weil aus früher harmlosen Infektionen plötzlich lebensbedrohende werden können. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme sind typische Vertreter solcher multiresistenten Keime. Staphylokokken findet man unter anderem auch in Lebensmitteln. Um einen Überblick über die Situation in Weichkäse zu erhalten, wurde im Rahmen einer Masterarbeit Weichkäse aus dem Schweizer Detailhandel auf die Anwesenheit von Staphylokokken untersucht. Die isolierten Staphylokokkenstämme, wurden identifiziert und phänotypisch und genotypisch auf Antibiotikaresistenzen untersucht. Zusätzlich wurde auf die Anwesenheit von Virulenzfaktoren, welche für die Bildung von Biofilmen von Bedeutung sind, untersucht.

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

31 verschiedene Weichkäseproben wurden im Schweizer Detailhandel eingekauft. Davon stammten 22 Weichkäse aus der Schweiz und neun aus Frankreich. 19 Käse wurden aus Kuhmilch, elf aus Ziegenmilch und eine aus Schafsmilch hergestellt. Zehn Käse wurden mit pasteurisierter Milch, drei mit thermisierter Milch und 18 mit roher Milch hergestellt.

Prüfverfahren

Staphylokokken wurden auf dem Selektivmedium MSA (Mannitol Salt Agar) isoliert. Die isolierten Keime wurden mittels Multiplex-PCR in Staphylokokken und Enterokokken eingeteilt. Staphylokokken und Isolate, die nicht zuordenbar waren, wurden mittels MALDI-TOF-MS, PCR-RFLP und DNA-Sequenzierung identifiziert.

Sämtliche Isolate der Gattung Staphylokokken wurden mit dem Microdilution-Test gemäss der neuen CLSI-Guideline auf allfällig vorhandene Antibiotikaresistenzen getestet. Aus dem Microdilution-Test ergibt sich der sogenannte MIC-Wert (MIC = minimal inhibitory concentration), der die minimale Konzentration für ein bestimmtes Antibiotika angibt, bei der eine Wachstumshemmung des untersuchten Keimes feststellbar ist.

Positive Isolate, wurden mittels Microarray Hybridisierung auf das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen untersucht. Der Nachweis auf Virulenzgene erfolgte mit klassischen PCR-Methoden.

Resultate / Nachweis und Identifikation von *Staphylococcus* spp.

Aus allen untersuchten Weichkäseproben wurden Keime isoliert. 105 dieser Isolate wurden mittels molekularbiologischen und biochemischen Methoden in die Gattung *Staphylococcus* eingeteilt. Insgesamt wurden 15 Stämme Staphylokokken auf 12 verschiedenen Käsesorten (12/31; 39%) detektiert. Von diesen 15 Stämmen handelte es sich in zwei Fällen um koagulase-positive *Staphylococcus aureus* mit einer Keimzahl pro Gramm von 5.5×10^3 , resp. 1.0×10^7 . Bei den 13 koagulase-negativen Staphylokokken handelte es sich um fünf Stämme *S. equorum*, um drei Stämme *S. xylosus*, um zwei Stämme *S. vitulinus* (zwei Stämme) und um je einen Stamm *S. saprophyticus*, *S. carnosus* und *S. fleurettii*.

Antibiotikaresistenzen

Diese 15 Stämme wurden auf 20 verschiedene phänotypische Antibiotikaresistenzen untersucht:

AMO = Amoxicillin	FUS = Fusidinsäure	PEN = Penicillin
AMP = Ampicillin	GEN = Gentamicin	RIF = Rifampicin
CHL = Chloramphenicol	KAN = Kanamycin	STR = Streptomycin
CIP = Ciprofloxacin	MET = Methycillin	TET = Tetracyclin
CLI = Clindamycin	MUP = Mupirocin	TRI = Trimethoprim
CLO = Cloxacillin	NAL = Nalidixinsäure	VAN = Vancomycin
ERY = Erythromycin	OXA = Oxacillin	

Sechs koagulase negative Staphylokokken-Stämme wiesen im Microdilution-Test eine Antibiotikaresistenz auf, die nicht einer intrinsischen Eigenheit der Gattung entspricht. Die genotypische Untersuchung dieser sechs Stämme durch Microarrayhybridisierung bestätigte in vier von sechs Stämmen die phänotypische Resistenz gegen Antibiotika mit der Anwesenheit eines oder mehrerer Antibiotikaresistenzgene:

Stamm	Phänotypische Resistenz gegen	MIC-Wert	Resistenzgene
<i>S. xylosus</i>	Tetracyclin	32 µg/ml	tet(K)
<i>S. xylosus</i>	Tetracyclin	16 µg/ml	tet(K)
<i>S. vitulinus</i>	Fusidinsäure	2 µg/ml	nicht nachweisbar
<i>S. equorum</i>	Erythromycin	32 µg/ml	mph(C), msr(A), msr(SA)
<i>S. saprophyticus</i>	Fusidinsäure	2 µg/ml	nicht nachweisbar
<i>S. fleurettii</i>	Ampicillin	0.5 µg/ml	mecA*

* Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme sind gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent sind. Ursächlich für die Resistenz gegen Methicillin ist das mecA Gen. In Studien wurde gezeigt, dass der horizontale Transfer des mecA-Gens zwischen Staphylococccen-Spezies vorkommt.

Biofilm-Virulenzgene

Bakterielle Biofilme werden in einem zweistufigen Prozess gebildet. Zuerst lagern die Bakterien an eine Oberfläche an, danach folgt eine anhaltende Besiedlung, die eine interzelluläre Kommunikation, Wachstum und Polysaccharidbildung beinhaltet. Die Fähigkeit einen Biofilm auszubilden, spielt eine wichtige Rolle in der Virulenz von Koagulase-negativen Staphylokokken und ermöglicht normalerweise apathogenen Keimen eine nokosomiale Infektion (Infektion in Krankenhaus) auszulösen. Bekannt sind beispielsweise Infektionen, die mit dem Anbringen von Kathetern verknüpft sind. Die Gene *icaA*, *icaD*, *fbe*, *embp* und *altE* haben eine Rolle in der Ausbildung von Biofilmen. Keines dieser Virulenzgene konnte in den Isolaten aus den Weichkäseproben nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen

In sechs von 31 Weichkäseproben wurden antibiotikaresistente Staphylokokken nachgewiesen. In vier Fällen wurde die phänotypische Resistenz durch das Vorhandensein von Resistenzgenen bestätigt. Sämtliche dieser Gene kodieren für Resistenzen gegen Antibiotikas, die in der Veterinärmedizin verwendet werden.

Der Nachweis des mecA-Gens, welches für die Methicillin-Resistenz kodiert, weist darauf hin, dass auch in Lebensmitteln multiresistente Keime vorkommen. Die Bedeutung eines Reservoirs an multiresistenten Keimen in Lebensmitteln für die klinische Behandlung von Infektionen ist zurzeit unbekannt, obwohl die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit einem multiresistenzen MRSA-Keim über ein Lebensmittel als eher klein einzuschätzen ist.

Die Untersuchung von antibiotikaresistenten Keimen werden wir in nächster Zukunft auf weitere Lebensmittelmatrices und Keime ausweiten.