



Gesundheitsdepartement des Kantons Basel-Stadt

Bereich Gesundheitsschutz

Kantonales Labor

Autorin: Dr. Claudia Bagutti

Nachweis von Antibiotikaresistenzen in Enterobakterien aus vorgekochten Teigwaren, Reis und Gemüse

Anzahl untersuchter Lebensmittelproben: 12

Anteil antibiotikaresistenter Enterobakterien Isolate: 22 von 31

Anteil antibiotikaresistenter Enterobakterien Isolate des Typs ESBL: 0 von 31

Anteil antibiotikaresistenter Enterobakterien Isolate des Typs AmpC: 8 von 31

Ausgangslage

In den letzten Jahren nahm der Anteil der antibiotikaresistenten Mikroorganismen deutlich zu. Insbesondere multiresistente *S. aureus* (MRSA) und gegen β -Laktame¹ resistente Enterobakterien wie beispielsweise *E. coli* EHEC O104:H4² und ESBL-(extended-spectrum- β -lactamase)-produzierende Enterobakterien wurden auch in der breiten Öffentlichkeit bekannt. Letztere weisen eine Resistenz gegen β -Laktame mit erweitertem Wirkungsspektrum auf und sind im Spital nur schwer therapierbar. In Enterobakterien sind die zum Typ AmpC β -Laktamasen gehörenden Enzyme sehr verbreitet, welche ein ähnlich breites Resistenzspektrum vermitteln wie die ESBLs.

Das zunehmende Auftreten von Antibiotikaresistenzen in Bakterien ist einerseits auf den übermässigen Einsatz von Antibiotika in der Human- wie auch in der Tiermedizin sowie in der Lebensmittelproduktion (Tierhaltung, Aquakulturen) zurückzuführen. Andererseits wird es durch die Eigenschaft der Bakterien begünstigt, Gene - wie Antibiotikaresistenzgene - durch horizontalen Gentransfer gegenseitig weitergeben zu können.

Neben dem direkten Weg durch eine Infektion mit einem resistenten Keim, kann eine Übertragung mit antibiotikaresistenten Bakterien via Nahrungsaufnahme erfolgen, welche darauf mit Bakterien des menschlichen Darmtraktes³ in Kontakt kommen. Die Evaluation der Wahrscheinlichkeit für eine derartige Übertragung von Antibiotikaresistenzen ist zur Zeit Gegenstand von Studien und Risikobewertungen⁴.

Untersuchungsziel

Mit der vorliegenden Studie sollte das Auftreten von Antibiotikaresistenzen in Enterobakterien (Familie der Enterobacteriaceae) aus vorgekochten Teigwaren, Reis und Gemüse untersucht werden. Die Isolate wurden auf Resistenzen analysiert, welche in Enterobakterien als humane Infektionserreger wiederholt nachgewiesen wurden⁵.

Gesetzliche Grundlagen

Bisher gibt es in der Schweiz und der EU noch 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 wurden aus 12 Lebensmittelproben von Restaurations- und Lebensmittelbetrieben 31 Bakterienisolate der Familie der Enterobakterien gesamt-

¹ β -Laktam-Antibiotika wirken durch Hemmung der Zellwandsynthese bei Bakterien.

² RKI (2011). Epidemiologisches Bulletin 35: 325-329.

³ Salyers, 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.

⁴ Bfr (2012) **002**; Hazards, E. P. o. B. (2011). EFSA J 9(8): 2322.

⁵ B. f. V. u. Lebensmittelsicherheit (2008). 1. Auflage. BVL, Berlin.

melt. Bei den Lebensmitteln handelte es sich um vorgekochte Teigwaren, Reis und Gemüse. Die 31 gewonnenen Enterobakterienisolate wurden untersucht (Tabelle). Folgende neun Spezies wurden dabei identifiziert:

Spezies der isolierten Enterobakterien (Anzahl Isolate)	
<i>Citrobacter freundii</i> (5)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)
<i>Enterobacter cloacae</i> (9)	<i>Morganella morganii</i> (1)
<i>Escherichia coli</i> (2)	<i>Pantoea agglomerans</i> (2)
<i>Hafnia alvei</i> (4)	<i>Rahnella aquatilis</i> (1)
<i>Klebsiella (Raoultella) ornithinolytica</i> (2)	

Fünf der neun aus den Lebensmitteln isolierten Enterobakterienspezies sind zumeist natürliche Besiedler des menschlichen Darms (*E. coli*, *E. cloacae*, *H. alvei*, *K. pneumoniae*, *M. morganii*). Bei den vier restlichen Arten handelt es sich um Umweltkeime, die u.a. im Wasser, auf Pflanzen oder Insekten vorkommen können. Bis auf *C. freundii* können alle anderen isolierten Enterobakterienarten in gesunden oder in immungeschwächten Individuen zu Infektionen führen, d.h. sie werden als pathogen (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. morganii*) bzw. als opportunistisch pathogen (*E. cloacae*, *H. alvei*, *R. ornithinolytica*, *P. agglomerans*, *R. aquatilis*) eingestuft. Alle Keime sind als Lebensmittelkontaminanten bekannt.

Prüfverfahren

Aufarbeitung der Lebensmittel und Isolierung der Enterobakterien erfolgte einerseits gemäss Schweizerischem Lebensmittelbuch oder äquivalenter validierter Methoden (nicht-selektive Isolierung mittels McConkey Agar). Zusätzlich wurde eine Isolierung mittels Selektivmedium (Cefotaxim-enthaltender McConkey Agar) durchgeführt. Letztere Anreicherung begünstigt das Wachstum von ESBL-bildenden Enterobakterien. Von jeder Probe wurden - falls vorhanden - je zwei Isolate vom Selektiv- wie auch vom Nicht-Selektivmedium gewonnen und analysiert. Die isolierten Enterobakterien wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie auf Speziesebene identifiziert.

Reihenverdünnungstest (Microdilution-Assay): Die Untersuchungen und Beurteilungen erfolgten gemäss SOP530 und nach den Richtlinien NCCLS⁶. Jedes Bakterienisolat wurde seriell in Flüssigmedium geimpft, welches das entsprechende Antibiotikum (siehe Tabelle der verwendeten Antibiotika) in abgestuften Konzentrationen enthielt. Die kleinste Konzentration, bei der kein Wachstum mehr erfolgt (Minimale Hemmkonzentration) ist ausschlaggebend für die Empfindlichkeit oder Resistenz.

Agardiffusionstest (Disk-Assay): Die Untersuchungen und Beurteilungen erfolgten gemäss SOP529 und nach den Richtlinien NCCLS⁶. Jedes zu untersuchende Bakterienisolat wurde als homogener Rasen auf einer Agarplatte ausgesät. Darauf wurden Papierblättchen (Disks; siehe Tabelle der verwendeten Antibiotika), die mit einem Antibiotikum imprägniert sind, aufgelegt und bebrütet. Die Grösse des Disk-Hemmhofs ist ausschlaggebend für die Empfindlichkeit oder Resistenz.

Verwendete Antibiotika bzw. mit den entsprechenden Antibiotika imprägnierte Disks (Abkürzung)

Ampicillin (AMP)	Ciprofloxacin (CIP)	Cefotaxim (CTX)*	Gentamycin (GEN)
Meropenem (MER)	Piperacillin (PIP)	Tetracyclin (TET)	Trimethoprim (TMP)

* nur im Microdilution-Assay verwendet

Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen mittels DNA-Microarray: Von einzelnen Isolaten wurde die DNA isoliert und mit dem Identibac AMR-ve ArrayTube™ Assay (Fa. Alere) auf das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen in Gram-negativen Bakterien untersucht.

ESBL + AmpC Screen ID Kit: Zum Nachweis von ESBL und AmpC β -Laktamasen wurden die auf CTX-Selektivmedium gewonnenen Isolate in einem Disk-Assay (Fa. Rosco, Alere) gleichzeitig mit folgenden CTX-Plättchen analysiert: CTX alleine, CTX + Clavulansäure (ESBL-Inhibi-

⁶ "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test: M100-S21" Vol. 30 des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, Wayne, Pa.).

tor), CTX + Cloxacillin (AmpC-Inhibitor) und CTX + Clavulansäure + Cloxacillin. Diese Analyse wurde mit allen auf Selektivmedium gewonnenen Isolaten sowie allen *E. cloacae*-Isolaten, welche bekanntermassen chromosomale AmpC β -Laktamasen enthalten, durchgeführt.

Ergebnisse

Von den 31 Enterobakterien Isolaten (22 auf Nicht-Selektivmedium; 9 auf Selektivmedium) wiesen 21 Isolate eine oder mehrere Antibiotikaresistenzen auf:

- Unter den mittels nicht-selektiven Mediums gewonnenen 22 Enterobakterien befanden sich sieben nicht-resistente Isolate, zwei Isolate wurden dem Status 'intermediär' gegenüber Ampicillin zugeordnet sowie 12 Isolate, welche eine Ampicillin-Resistenz aufwiesen. In einem der Ampicillin-resistenten Isolate wurde ausserdem eine Resistenz gegen Trimethoprim festgestellt.

Isolatnummer	Spezies des Isolats	Phänotypische Resistenz*	Folgerung: Resistenz gg.
PK110216/2-oCTX	<i>E. cloacae</i>	-	nicht resistent gegenüber den getesteten Antibiotika (7 Isolate)
PK110221/2-oCTX	<i>E. cloacae</i>	-	
WE110222/1-oCTX	<i>E. cloacae</i>	-	
WE110222/3-oCTX	<i>E. cloacae</i>	-	
WE110223/3-oCTX	<i>P. agglomerans</i>	-	
WE110229/3-oCTX	<i>E. coli</i>	-	
WE110229/6-oCTX	<i>E. coli</i>	-	
DB120108/1oCTX	<i>C. freundii</i>	amp (intermediär)	intermediär gegenüber Ampicillin (2 Isolate)
DB120108/3-oCTX	<i>C. freundii</i>	amp (intermediär)	
WE110223/1-oCTX	<i>P. agglomerans</i>	amp	resistent gegenüber Ampicillin (12 Isolate)
PK110216/6-oCTX	<i>R. ornithinolytica</i>	amp	
PK110221/3-oCTX	<i>E. cloacae</i>	amp	
DB120035/2-oCTX	<i>M. morgani</i>	amp	
DB120102/1-oCTX	<i>K. pneumoniae</i>	amp	
DB120102/3-oCTX	<i>K. pneumoniae</i>	amp	
DB120103/1-oCTX	<i>K. pneumoniae</i>	amp	
DB120103/2-oCTX	<i>K. pneumoniae</i>	amp	
DB120105/1-oCTX	<i>K. pneumoniae</i>	amp	
DB120105/2-oCTX	<i>E. cloacae</i>	amp	
DB120107/3-oCTX	<i>R. ornithinolytica</i>	amp	
DB120107/4-oCTX	<i>H. alvei</i>	amp	
PK110220/6-oCTX	<i>E. cloacae</i>	amp, tmp	resistent gegenüber Ampicillin und Trimethoprim

* Resultat aus Disk- und Microdilution Assay

- Auf Selektivmedium, welches die Anreicherung von ESBL- oder AmpC-produzierenden Enterobakterien begünstigt, wurden 9 Isolate gewonnenen. Davon wurden 8 als resistent gegenüber β -Laktame des Typs AmpC (Penicilline, 2. und 3. Generation Cephalosporinasen inkl. β -Laktam/Inhibitor Kombinationen und Cefamycine) identifiziert:

Isolatnummer	Spezies des Isolats	Phänotypische Resistenz*	β -Laktamasen Resistenzgen	Folgerung: Resistenz gg.
DB120102/4-mCTX	<i>H. alvei</i>	AmpC	bla _{AAC-1}	resistent gegenüber β -Laktame des Typs AmpC (Penicillinen, 2. und 3. Generation Cephalosporinasen inkl. β -Laktam/Inhibitor Kombinationen und Cefamycine)
DB120102/5-mCTX	<i>H. alvei</i>	AmpC	bla _{AAC-1, 2}	
DB120108/1-mCTX	<i>C. freundii</i>	AmpC	bla _{CMY} , bla _{MOX}	
DB120108/5-mCTX	<i>C. freundii</i>	AmpC	bla _{CMY}	
DB120102/3-mCTX	<i>C. freundii</i>	AmpC	n.n. [§]	
PK110216/1-mCTX	<i>E. cloacae</i>	AmpC	n.n. [§]	
DB120105/1-mCTX	<i>E. cloacae</i>	AmpC	n.n. [§]	
PK110220/6-mCTX	<i>H. alvei</i>	AmpC	n.n. [§]	
PK110220/1-mCTX	<i>R. aquatilis</i>	amp	n.n. [§]	resistent gegenüber Ampicillin

* Resultat aus ESBL + AmpC Screen ID Kit (Ausnahme: Isolat PK110220/1-mCTX, welches weder ESBL- noch AmpC-positiv war, aber mittels Disk-Assay eine Ampicillin-Resistenz aufwies.)

§ n.n.: kein β -Laktamasen Resistenzgen nachgewiesen

Schlussfolgerungen

- Alle aus den untersuchten Lebensmitteln isolierten Enterobakterienarten sind bekannt als Lebensmittelkontaminanten: Es handelt sich dabei um Darmbakterien und um Umweltkeime, die entweder pathogen oder opportunistisch pathogen sind.
- Die vielen Enterobakterienarten eigene Resistenz gegen Ampicillin, welche vor allem bei *K. pneumoniae*, *M. morganii*, *R. ornithinolytica*, *E. cloacae* und *P. agglomerans* ausgeprägt vorhanden ist, wurde auch in den gefundenen Isolaten mehrheitlich nachgewiesen.
- Acht Isolate wiesen eine Resistenz gegenüber β -Laktame des Typs AmpC auf. Bei diesem Typ handelt es sich – ähnlich wie bei den ESBL – um eine Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika mit erweitertem Wirkungsspektrum, also sowohl gegen Penicilline, Cephalosporinasen der 2. und 3. Generation, inkl. β -Laktam/Inhibitor Kombinationen und Cefamycine. Kommt es zu Infektionen mit Erregern dieses Resistenztyps, sind somit alle in diese Kategorien fallenden Antibiotika wirkungslos.
- Die acht Isolate stammen von fünf Lebensmittelproben. Dies entspricht 42 % der gesamthaft erhobenen Probenzahl. Es handelt sich in drei Fällen um vorgekochte Teigwaren und zwei vorgekochte Gemüsebeilagen.
- Obwohl die Übertragung einer Antibiotikaresistenz über die Nahrungsaufnahme auf fakultativ pathogene Keime als eher gering einzustufen ist, wurden diese Zusammenhänge in Studien für möglich erachtet. Bedeutend ist in diesem Zusammenhang, dass gerade die gefundenen Resistenzgene zu denjenigen gehören, die sich auf Plasmiden (mobile genetische Elemente) befinden und so leichter auf andere Bakterien übertragen werden können.
- Die Ergebnisse dieser Studie werden dem Bundesamt für Gesundheit zur Kenntnis gebracht.
- Die Untersuchung von antibiotikaresistenten Bakterien aus Lebensmitteln wird das Kantonale Labor in nächster Zukunft fortsetzen und auf weitere Keime (u.a. Enterobakterien, Enterokokken) ausweiten.