

Diplomarbeit

**Prävalenz und Antibiotikaresistenz von
Escherichia coli in Spielplatzsandproben**

eingereicht von

Florian Lorenz

Geb.Dat.: 07.09.1988

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin

(Dr. med. dent.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin

unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Franz Reinthaler

Dr.rer.nat. Alexandra Badura

Graz, Jänner 2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 30.01.2014

Florian Lorenz

Danksagung

Ich bedanke mich an dieser Stelle bei Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Franz Reinthaler für die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit.

Des weiteren gilt mein Dank Ass.Prof.Dr.med.univ.Gebhard Feierl für die Vermittlung dieser Arbeit, sowie seine Hilfe beim Korrekturlesen.

Ganz besonders möchte ich mich für die sowohl persönlich, wie fachlich sehr gute Betreuung von Frau Dr.rer.nat. Alexandra Badura bedanken, die mir mit viel Geduld die Aspekte des wissenschaftlichen Forschens und Arbeitens näher gebracht hat, mir stets hilfreich zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Zudem gilt mein Dank den Mitarbeitern des Labors für Medizinische Bakteriologie und Mykologie des Institutes für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin für die Kooperation bei den Laboruntersuchungen. Ich möchte mich auch bei meinem Freund Stefan Promitzer bedanken, der sich Zeit genommen und mir bei der Entnahme der Sandproben geholfen hat.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Freundin und Mutter meiner Söhne, Pia Schreitter, die mir im Verlauf der Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Zusammenfassung

ZIEL: Das Ziel der vorliegenden Studie war eine Prävalenzerhebung von *E. coli* und coliformen Bakterien im Spielsand aus allen öffentlichen Kindersandspielplätzen in Graz. Außerdem wurden Zusammenhänge mit abiotischen Parametern untersucht. Alle *E. coli* Isolate wurden zudem hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenz getestet.

METHODIK: Im Juli 2013 wurden Proben von allen 45 öffentlichen Kindersandspielplätzen nach einer standardisierten Methodik entnommen. Die Proben wurden im mikrobiologischen Labor auf das Vorhandensein von *E. coli* und coliformen Bakterien untersucht, Keimzahlen wurden mittels Verdünnungsreihen errechnet. Statistische Zusammenhänge mit abiotischen Parametern wurden mit Korrelations- und Regressionsanalysen ermittelt. Das Resistenzverhalten der *E. coli* Isolate wurde mittels Vitek 2 (bioMérieux) und der Agardiffusionsmethode bestimmt.

ERGEBNISSE: In 22 (49%) von 45 untersuchten Sandspielplätzen konnten *E. coli* nachgewiesen werden. Der Mittelwert der errechneten Keimzahlen betrug $1,6 \times 10^4$ CFU/100g Sand; in vier Proben gelang der Nachweis nach einem Anreicherungsschritt. Statistisch konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Wassergehalt des Sandes und der Keimzahl für coliforme Bakterien nachgewiesen werden ($p=0,01$). Keine signifikanten Korrelationen wurden zwischen dem Nachweis von *E. coli* und den erhobenen abiotischen Parametern (z.B. Einzäunung, Verunreinigung...) gefunden. Insgesamt wurden 96 *E. coli* Isolate hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens getestet, davon waren 18 (19%) resistent oder intermediär empfindlich gegen ein oder mehrere Antibiotika. Folgende Resistenzraten wurden ermittelt: Ampicillin: 12,5%; Piperacillin: 10,4%; Amoxicillin/Clavulansäure: 9,4%; Piperacillin/Tazobactam: 5,2%; Tetracyclin: 6,3%; Trimethoprim/Sulfmethoxazol: 6,3%; Cefuroxim: 3,1%; Moxifloxacin: 2,1%; Ciprofloxacin: 1%. Es wurden keine ESBL-Bildner gefunden.

SCHLUSSFOLGERUNG: Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass öffentliche Sandspielplätze ein Reservoir für *E. coli* mit erworbener Antibiotikaresistenz darstellen; diese Keime wurden in unterschiedlichen Quantitäten nachgewiesen und könnten möglicherweise eine Infektionsquelle für spielende Kinder darstellen.

Abstract

Prevalence and Antibiotic Resistance Patterns of *E. coli* Isolates from Sandpits

OBJECTIVE: To determine the prevalence of *E. coli* and coliform bacteria found in sandpits taken from all public children playgrounds in Graz, Austria and to analyse the statistical correlations between microbiological results and non-microbial parameters as well as to assess the frequency of antimicrobial resistance in *E. coli* isolates.

METHODS: In July 2013, samples of sand were collected from sandpits at all 45 public children playgrounds in Graz, Southeast Austria using a standardized sampling procedure. These samples were analysed for the presence of *E. coli* by standard microbiological methods. For quantitative evaluation the numbers of colony forming units of *E. coli* were determined using serial dilutions and an enrichment step. Associations of microbiological and non-microbial parameters were explored using regression and correlation analyses. *E. coli* isolates were tested for susceptibility to a wide set of antibiotics by the Vitek 2 system (bioMérieux) and the disc diffusion method.

RESULTS: 22 out of the 45 collected sand pits samples gathered at public children playgrounds in Graz tested positive for *E. coli* (49%). The mean concentration of *E. coli* in the sand samples was 1.6×10^4 CFU/100g sand; in four samples *E. coli* was isolated after enrichment. The statistical analysis showed that the concentration of coliform bacteria was correlated with the water content of the sand ($p=0,01$). No significant correlations were found between *E. coli* concentrations and abiotic parameters. In total, 96 *E. coli* isolates were tested for their antimicrobial resistance patterns. Eighteen *E. coli* isolates (19%) were resistant or intermediate susceptible to one or more antimicrobial agents tested. The following resistance rates to selected agents were found: ampicillin: 12.5%; piperacillin, 10.4%; amoxicillin/clavulanic acid: 9.4%; piperacillin/tazobactam: 5.2%; tetracyclin: 6.3%; cotrimoxazole: 6.3%; cefuroxime: 3.1%; moxifloxacin: 2.1%; ciprofloxacin: 1%. ESBL producers were not detected among the *E. coli* isolates.

CONCLUSION: This study aimed to investigate the role of playground sand as a potential reservoir for *E. coli* and coliform bacteria both of which were detected in different quantities in the collected samples taken from sandpits at public children's playgrounds in Graz. Therefore sandboxes might also constitute a reservoir for *E. coli* resistant to various antibiotics that can potentially be transferred to children.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	3
ZUSAMMENFASSUNG	4
ABSTRACT	5
INHALTSVERZEICHNIS	6
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	7
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	10
1.1 ANTIBIOTIKARESISTENZ	10
1.2 PROBLEM DER ANTIBIOTIKARESISTENZZUNAHME.....	11
1.3 RESISTENZZUNAHME IN DER UMWELT	13
1.4 RESISTENZZUNAHME BEI GESUNDEN	14
1.5 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	15
1.6 FRAGESTELLUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 UNTERSUCHUNGSGEBIET	18
2.2 PROBENENTNAHME	21
2.3 WEITERVERARBEITUNG IM MIKROBIOLOGISCHEN LABOR	24
2.3.1 <i>Sandfeuchtebestimmung</i>	25
2.3.2 <i>Verwendete Nährsubstrate</i>	26
2.3.3 <i>Keimzahlbestimmung</i>	28
2.3.4 <i>Screening auf multiresistente Erreger</i>	29
2.3.5 <i>Identifizierung der Bakterienisolate</i>	29
2.3.6 <i>Resistenztestung der Bakterienisolate</i>	30
3 ERGEBNISSE	33
3.1 SPIELPLATZBESCHREIBUNG	33
3.2 NACHWEIS VON <i>E. COLI</i> UND COLIFORMEN BAKTERIEN.....	34
3.2.1 <i>Vorhandensein von E. coli und coliformen Bakterien</i>	34
3.2.2 <i>Arten der coliformen Bakterien</i>	35
3.2.3 <i>Keimzahlen</i>	35
3.2.4 <i>Korrelationen Keimzahlen – abiotische Parameter</i>	37
3.2.5 <i>Korrelationen Keimnachweis – abiotische Parameter</i>	44
3.2.6 <i>Korrelationen metrische Daten - Keimzahlen</i>	48
3.3 ANTIBIOTIKARESISTENZ	49
3.3.1 <i>Ergebnis der Resistenztestung für E. coli</i>	49
3.4 SCREENING AUF <i>S. AUREUS</i>	54
3.5 SCREENING AUF MULTIRESISTENTE ERREGER	54
4 DISKUSSION	55
5 LITERATURVERZEICHNIS	61

Glossar und Abkürzungen

CFU	Colony Forming Unit (Englisch); Koloniebildende Einheit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended-Spektrum-Betalaktamasen
MALDI-TOF MS	„Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry“ (Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation Flugzeit Massenspektrometrie)
MH	Mueller-Hinton-Agar
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
MRGN	Multiresistente gramnegative Bakterien
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MUG	Medizinische Universität Graz
VRE	Vancomycin resistente Enterokokken

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übertragungspfade für antibiotikaresistente Bakterien zw. Menschen, Tieren, Lebensmitteln und Umwelt (Martins da Costa et al., 2013).....	13
Abbildung 2: <i>E. coli</i> mit Resistenz gegen 3. Gen. Cephalosporine	16
Abbildung 3: Öffentliche Spielplätze in Graz	19
Abbildung 4: Probenentnahme	21
Abbildung 5: Schema Probenentnahme im Meterraster	22
Abbildung 6: Meterraster	22
Abbildung 7: Probenverarbeitung im mikrobiologischen Labor	24
Abbildung 8: Rotator	25
Abbildung 9: Verdünnungsreihe	28
Abbildung 10: Wachstum auf COLI/Coliforme Agar	29
Abbildung 11: Häufigkeit Keimzahl <i>E. coli</i>	36
Abbildung 12: Häufigkeit Keimzahl Coliforme	36
Abbildung 13: Keimzahlen <i>E. coli</i> (Einzäunung)	37
Abbildung 14: Keimzahlen <i>E. coli</i> (Wasserhabitat)	38
Abbildung 15: Keimzahlen <i>E. coli</i> (Wasserspielplatz)	38
Abbildung 16: Keimzahlen <i>E. coli</i> (Witterung)	39
Abbildung 17: Keimzahlen <i>E. coli</i> (Beschattung)	39
Abbildung 18: Keimzahlen <i>E. coli</i> (Verunreinigung)	40
Abbildung 19: Keimzahlen <i>E. coli</i> (Zustand)	40
Abbildung 20: Keimzahlen Coliforme (Einzäunung).....	41
Abbildung 21: Keimzahlen Coliforme (Wasserhabitat).....	41
Abbildung 22: Keimzahlen Coliforme (Wasserspielplatz)	42
Abbildung 23: Keimzahlen Coliforme (Witterung)	42
Abbildung 24: Keimzahlen Coliforme (Beschattung).....	43
Abbildung 25: Keimzahlen Coliforme (Verunreinigung)	43
Abbildung 26: Keimzahlen Coliforme (Zustand).....	44
Abbildung 27: Korrelation Keimzahl-Wassergehalt Coliforme	48
Diagramm 1: Antibiotikaresistenz in Prozent.....	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Adressen der öffentlichen Grazer Spielplätze mit Sandspielplatz.....	20
Tabelle 2: Spielplatzprotokoll.....	23
Tabelle 3: Antibiotikastempel mit den getesteten Substanzen für <i>Enterobacteriaceae</i>	31
Tabelle 4: Vitek 2 AST Karte N196	32
Tabelle 5: Beschreibung Spielplätze I	33
Tabelle 6: Beschreibung Spielplätze II	34
Tabelle 7: Vorhandensein von <i>E. coli</i> und Coliforme	34
Tabelle 8: Vorkommen coliformer Keime	35
Tabelle 9: Errechnete Keimzahlen (n.A. = nach Anreicherung).....	35
Tabelle 10: Kreuztabelle Einzäunung <i>E. coli</i>	45
Tabelle 11: Kreuztabelle Wasserhabitat <i>E. coli</i>	45
Tabelle 12: Kreuztabelle Wasserspielplatz <i>E. coli</i>	46
Tabelle 13: Kreuztabelle Beschattung <i>E. coli</i>	46
Tabelle 14: Kreuztabelle Verunreinigung <i>E. coli</i>	47
Tabelle 15: Kreuztabelle Zustand <i>E. coli</i>	47
Tabelle 16: Korrelation Keimzahl-Wassergehalt	48
Tabelle 17: Resistenzverhalten <i>E. coli</i>	50
Tabelle 18: Resistenzverhalten der einzelnen Isolate 1	52
Tabelle 19: Resistenzverhalten der einzelnen Isolate 2.....	53
Tabelle 20: Vergleich Resistenzraten <i>E. coli</i>	59

1 Einleitung

1.1 Antibiotikaresistenz

Antibiotika zählen zu den größten Erfindungen in der Medizin. Am Beginn ihrer Einführung in den 1940er Jahren trugen sie zur massiven Reduktion von Infektionskrankheiten, die sogar zum Tode führen konnten, bei.¹ Man nannte sie aus diesem Grunde „wonder drugs“, die Wunder der modernen Medizin.² Die Wahrscheinlichkeit, an einem frühzeitigen Tod aufgrund einer Infektion zu sterben, wäre 40% höher, wenn Antibiotika nicht zur Verfügung stehen würden.³ Obwohl die Gesundheit und die Lebenserwartung der Menschen durch Antibiotika enorm verbessert wurden, zeigten sich bereits wenige Jahre nach ihrer Einführung die ersten Resistenzphänomene. Weltweit wird dieses Thema ein immer größer werdendes Problem für die Menschheit.

Neben der natürlichen (primären) Resistenz vieler Erreger durch Fehlen der Zielstruktur für einzelne Antibiotikaklassen, kommt der erworbenen (sekundären) Resistenz eine besondere Bedeutung zu. Es kann verschiedene Ursachen für diese sekundäre Resistenz geben⁴:

- a.) Synthese inaktivierender Enzyme: z.B.: β -Laktamasen
- b.) Veränderung der Zellwandpermeabilität
- c.) Veränderung der Zielstruktur, an welcher das Antibiotikum angreift
- d.) Aktive Transportsysteme, die Antibiotika wieder aus der Zelle transportieren

Weiters können Bakterien Gene von bereits resistenten Organismen übernehmen. Dies kann durch drei verschiedene Prozesse erfolgen:

(1) Centers for Disease Control and Prevention 2010

(2) World Health Organization 2011

(3) Martins da Costa et al. 2013

(4) Feierl et al. 2012

a) Transformation - Aufnahme freier DNA

Bei der Transformation nimmt der Mikroorganismus freie DNA aus der Umgebung auf, für diesen Vorgang muss die Zelloberfläche kompetent für die DNA Aufnahme (durch Membranproteine) sein.

b) Transduktion – mittels Bakteriophagen

Bei der Transduktion wird resistenzkodierende DNA durch einen Bakteriophagen übertragen. Diese Art des Resistenzerwerbs gelingt nur, wenn die Phageninfektion nicht zur Lyse des Bakteriums führt.

c) Konjugation – durch Zellkontakte

Das Bakterium bildet bei der Konjugation einen Sexpilus aus, durch den es eine Verbindung mit einem Rezipienten herstellen kann, über die Plasmid-DNA oder auch Fragmente des Chromosoms übertragen werden.⁵ Die Konjugation findet vorwiegend bei gramnegativen Bakterien statt.⁶

1.2 Problem der Antibiotikaresistenzzunahme

In der Humanmedizin werden die Verwendung von antibakteriellen Wirkstoffen für die Behandlung viraler Infektionen, der ungerechtfertigte Einsatz von Substanzen bei Eingriffen und der Einsatz von Antibiotika bei bloßer Kolonisierung (und nicht Infektion) des Patienten/der Patientin als die wesentlichen Ursachen des Resistenzproblems angesehen.⁷

Die Zunahme von resistenten und multiresistenten Keimen ist ein internationaler Trend, der auch in Österreich zu beobachten ist. Die wichtigsten multiresistenten Erreger sind Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Vancomycin-resistente Enterokokken* (VRE), sowie multiresistente, gramnegative Bakterien

(5) Centers for Disease Control and Prevention 2010

(6) Suerbaum et al. 2012

(7) Bundesministerium für Gesundheit 2012

(MRGN) einschließlich der „Extended-Spectrum Beta-Lactamase“ (ESBL)- bildenden Bakterien. Diese Bakterien produzieren Betalactamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum, was eine Resistenz gegen Breitspektrum-Cephalosporine und Monobactame bewirkt. Dabei handelt es sich meist um *E. coli*, *Klebsiella spp.*, aber auch um andere Enterobakterien.⁸ In den letzten Jahren ist weltweit eine drastische Zunahme von ESBL-Bildnern zu verzeichnen, besonders auf Intensivstationen, aber auch in urologischen Abteilungen, sowie bei ambulant erworbenen Harnwegsinfektionen.⁹

Die Schwierigkeit bei der Behandlung von Patienten liegt darin, dass die ESBL-produzierenden Bakterien häufig zusätzlich resistent gegen diverse Antibiotika sind. Vor allem bei multiresistenten ESBL-produzierenden *E. coli* sollten die behandelnden Ärzte daher auf etwaige Therapiemisserfolge vorbereitet sein.¹⁰

MRGN sind in den 1990er-Jahren zunehmend in den Fokus gerückt und haben sich weltweit zum wichtigsten infektionsmedizinischen Problem entwickelt. Die hohe Veränderungsrate der gramnegativen Genome erlaubt eine bemerkenswerte Anpassungsfähigkeit dieser Organismen und ist vermutlich ein wichtiger Faktor bei der Entstehung und Verbreitung von Resistenzmechanismen. MRGN sind zurzeit das dringendste infektiologische Problem, welches nur durch gute Diagnostik, rationale Therapieentscheidungen und konsequente Infektionskontrolle verbessert werden kann.¹¹

Das Risiko einer Infektion nach Besiedelung mit multiresistenten gramnegativen Bakterien wird auf 25% geschätzt und wird durch Risikofaktoren wie längere Krankenhausaufenthalte, invasive Maßnahmen, schwere Vorerkrankungen und die Gabe von Antibiotika begünstigt. Das Risiko, dass sich aus einer Besiedelung eine Infektion entwickelt, beträgt bei Krankenhauspatienten 11 bis 38%.¹²

(8) Feierl et al. 2012

(9) Kruse & Dettenkofer 2010

(10) Pitout & Lauplan 2008

(11) Schröppel & Riessen 2013

(12) Kruse & Dettenkofer 2010

1.3 Resistenzzunahme in der Umwelt

Der Gebrauch von antimikrobiellen Substanzen ist die treibende Kraft für das Aufkommen und die Verbreitung von antimikrobieller Resistenz.¹³ Das Problem der Antibiotikaresistenz ist ein multifaktorielles, das neben der Humanmedizin auch die Veterinärmedizin, die Landwirtschaft und die Umwelt betrifft.

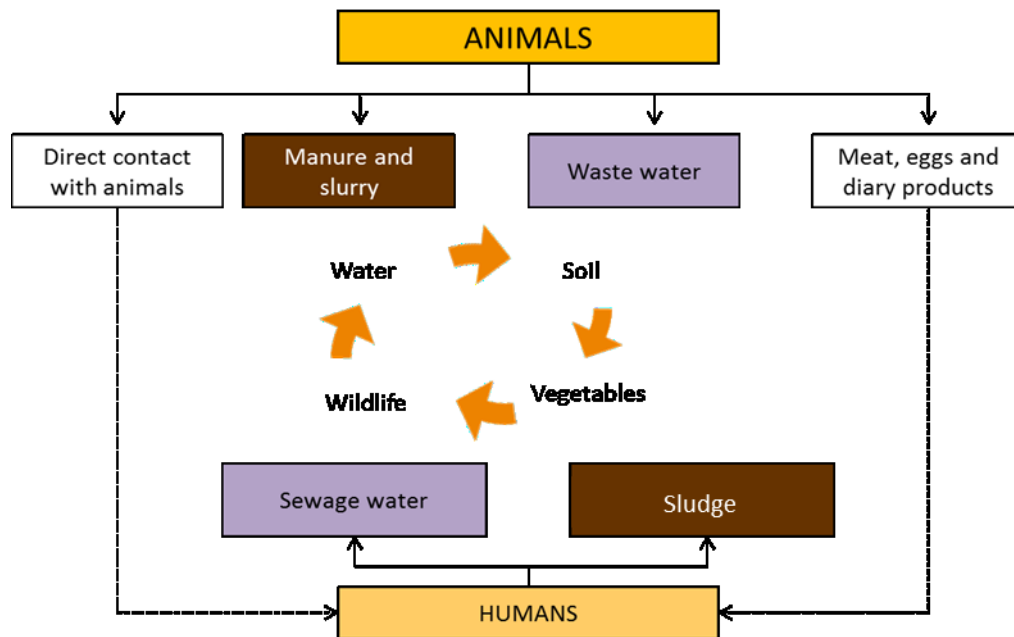


Abbildung 1: Übertragungspfade für antibiotikaresistente Bakterien zw. Menschen, Tieren, Lebensmitteln und Umwelt
(Martins da Costa et al., 2013)

Antibiotikaresistente Bakterien werden in großen Mengen in die Umwelt eingetragen. Zum einen werden sie aus der Intensivtierhaltung über Gülle und Mistausbringung direkt in die Umwelt eingebracht, zum anderen aus klinischem und häuslichem Abwasser in den Kläranlagen gesammelt und in die Umwelt freigesetzt.¹⁴ Inwieweit die Pfade über die Umwelt zum Problem der Verbreitung von resistenten Krankheitserregern beitragen, ist noch nicht genau untersucht.¹⁵

(13) Martins da Costa et al. 2013

(14) Feuerpfeil et al. 1999

(15) Vgl. ebd.

Das Phänomen der mikrobiellen Resistenz beruht auf einer genetischen Formbarkeit der Bakterien. Es entwickelte sich aufgrund eines Übergebrauchs von antimikrobiellen Substanzen in der Humanmedizin, Tiermedizin, Fischzucht, Landwirtschaft und Lebensmitteltechnologie. Die erhöhte Mobilität von Menschen und Lebensmitteln sowie die Abwesenheit ökologischer Barrieren zwischen den verschiedenen Lebensgemeinden haben das Risiko der Resistenzverbreitung weltweit erhöht.

Aufgrund der erwünschten Leistungssteigerung und Krankheitsprävention lässt das aktuelle Tierproduktionssystem keine Toleranz für Krankheitsausbrüche bei Nutztieren zu. Deswegen werden bereits einige antibiotische Stoffe auf subtherapeutischem Level zur Krankheitsprävention verwendet.

Paradoxerweise zeigt der Gebrauch von Antibiotika in der Tierzucht wichtige Parallelen zum Gebrauch in Krankenhäusern:

- In beiden ökologischen Nischen werden Antibiotika häufig verschrieben
- Antibiotika werden oft nur zur Krankheitsvorsorge und nicht zur eigentlichen Therapie verschrieben

Manche antimikrobielle Substanzen können die Prozesse in Kläranlagen überleben, folgenderweise werden sie in den Boden und in das Wasser freigesetzt. Diese Antibiotika sind weder in Sedimenten, noch im Abwasser abbaubar.¹⁶

1.4 Resistenzzunahme bei Gesunden

Antibiotikaresistente Bakterien sind auch in hohem Maße in den Fäkalien gesunder Menschen nachweisbar und gelangen von dort ins Abwasser. Die Darmflora gesunder Menschen stellt somit ein beachtliches Reservoir an antibiotikaresistenten Bakterien dar. Bei einer in Frankreich durchgeführten Studie wurde die Prävalenz von ESBL - produzierenden Enterobakterien bei Kindern im Alter von 6 bis 24 Monaten analysiert. Die Untersuchungen, die in pädiatrischen Praxen durchgeführt

(16) Martins da Costa et al. 2013

wurden, ergaben, dass 4,6% der Kinder ESBL - produzierende Enterobakterien in sich trugen.¹⁷

Eine weitere Studie, die bei gesunden schwedischen Vorschulkindern durchgeführt wurde ergab, dass 2,9% der Kinder von ESBL - produzierende Bakterien besiedelt waren - der häufigste Vertreter war *E. coli*.¹⁸ Bisher gibt es noch keine wissenschaftlichen Studien, die mögliche Übertragungswege von antibiotikaresistenten Bakterien aus der Umwelt auf Kinder untersucht haben.

1.5 *Escherichia coli*

E. coli ist ein gramnegatives, nicht sporenbildendes Stäbchen, das Glucose fermentiert und zur Familie der Enterobakterien gezählt wird, welche der normalen Darmflora angehören.¹⁹ Als ein natürlicher Bewohner des menschlichen und tierischen Darmtraktes macht der Anteil von *E. coli* etwa 1% der menschlichen Darmflora aus. Man unterscheidet apathogene, fakultativ pathogene und obligat pathogene Stämme. Fakultativ pathogene Stämme können unter anderem zu Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen, Peritonitis, Appendizitis, Sepsis sowie bei Säuglingen zu Meningitis führen. Obligat pathogene Stämme verursachen intestinale Infektionen.²⁰

Coliforme Bakterien sind eine heterogene Gruppe, die zu den Enterobakterien zählt. Zur Gruppe der coliformen Bakterien gehören verschiedene Genera wie *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Klebsiella* – sie alle weisen gemeinsame, biochemische Eigenschaften auf.

Das coliforme Konzept beinhaltet alle coliformen Bakterien, einschließlich Bakterien ohne fäkalen Ursprung, welche kein Gesundheitsproblem darstellen. Das einzige Bakterium, das ausschließlich fäkalen Ursprungs ist und rund 95% der Enterobakterien der Fäzes ausmacht, ist *E. coli*.

E. coli wird als Indikatorbakterium herangezogen, um fäkale Verunreinigungen von Trinkwasser und Lebensmittel aufzuzeigen. Für *E. coli* fokussiert sich das Problem der Antibiotikaresistenz insbesondere auf ESBL bildende Stämme. Die Resistenzlage

(17) Birgy et al. 2012

(18) Kaarme et al. 2013

(19) Universität Wien 2013

(20) Suerbaum et al. 2012

für diesen Erreger ist in Österreich im internationalen Vergleich erfreulicherweise gut, insbesondere im Krankenhaus ist jedoch auch bei uns eine allmähliche Resistenzzunahme zu beobachten. Für das Jahr 2012 wurde für Österreich der Anteil an ESBL-bildenden *E. coli* Isolaten unter allen invasiven Isolaten mit 14,1 % angegeben mit einem kontinuierlichen Anstieg seit 2008.²¹

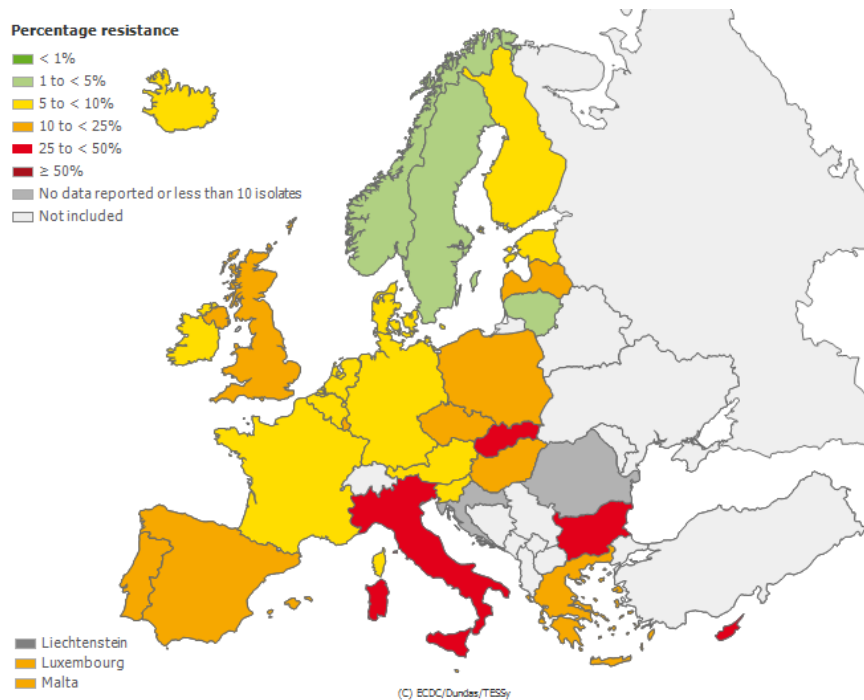


Abbildung 2: *E. coli* mit Resistenz gegen 3. Gen. Cephalosporine²²

Das zunehmende Auftreten von Enterobakterien (*Klebsiella*, *E. coli*, ...) mit erworbener Resistenz gegen die Gruppe der Carbapenemantibiotika stellt ein weiteres sehr ernstes infektiologisches Problem dar. Die große Gefahr liegt in den limitierten Therapieoptionen im Falle einer Infektion, da diese Erreger sowohl gegen Betalaktam-Antibiotika als auch gegen andere Antibiotikaklassen resistent sind. Für Österreich sind zurzeit nur vereinzelt solche Stämme beschrieben.²³

(21) Bundesministerium für Gesundheit 2013

(22) Vgl.ebd.

(23) Vgl.ebd

1.6 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen der vorliegenden Studie erarbeitet:

- Erarbeitung einer Beprobungsmethodik für die mikrobiologische Untersuchung von Sandspielplätzen. Dabei sollten der qualitative und quantitative Keimnachweis mittels einer vergleichbaren Vorgehensweise durchgeführt werden.
- Prävalenzerhebung von *E. coli* und coliformen Bakterien in öffentlichen Sandspielplätzen. Dabei sollten alle öffentlichen Grazer Sandspielplätze auf das Vorhandensein von *E. coli* und coliformen Keimen untersucht werden. Keimzahlen sollten errechnet werden.
- Zusammenhang mit abiotischen Parametern. Dabei sollten Zusammenhänge zwischen den mikrobiologischen Ergebnissen und zusätzlich erhobenen abiotischen Parametern, die die einzelnen Spielplätze charakterisieren, untersucht werden. Statistische Korrelationsberechnungen sollten signifikante Zusammenhänge aufzeigen.
- Bestimmung der Antibiotikaresistenz von den isolierten *E. coli* Stämmen. Dabei sollte das Resistenzverhalten gegen ausgewählte Antibiotika von allen *E. coli* Stämmen aus Sandspielplätzen ausgewertet werden. Zusätzlich sollten multiresistente Erregergruppen erfasst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgebiet

Von 72 öffentlichen Spielplätzen der Stadt Graz waren zum Untersuchungszeitpunkt 45 mit einem Sandspielplatz ausgestattet. In folgendem Stadtplan von Graz sind die öffentlichen Kinderspielplätze rot eingezeichnet:

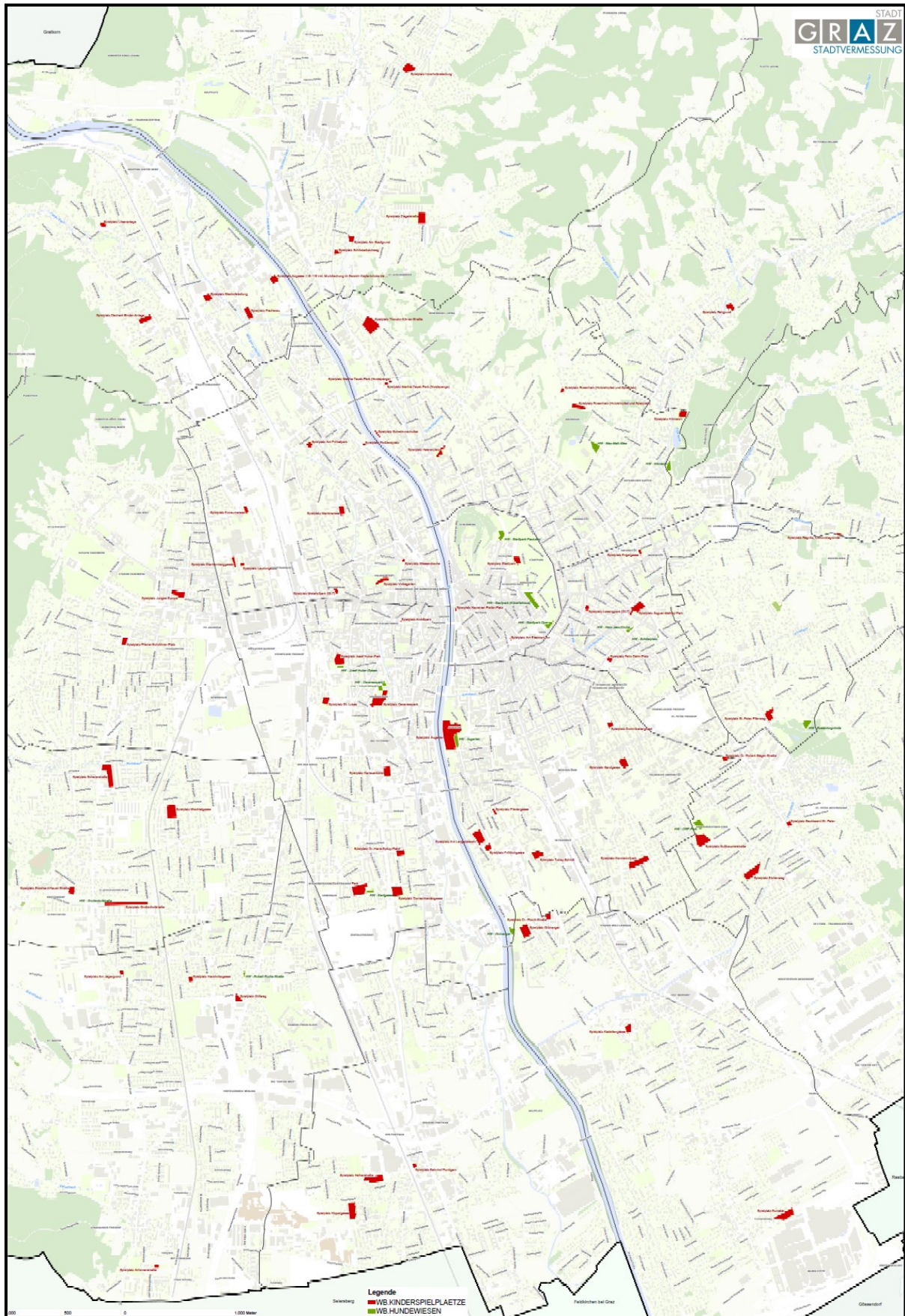


Abbildung 3: Öffentliche Spielplätze in Graz

Öffentliche Kinderspielplätze mit Sandspielplatz in Graz

	Spielplatz:	Adresse:
1	Haselweg	Fliedergasse/Haselweg
2	Am Langedelwehr	Am Langedelwehr/Neulandgasse
3	Augarten	Augarten
4	Dr.-Plochl-Straße	Kasernstraße 70-72
5	Eurostar	Ampfererweg/Fuchsenfeldweg
6	Grünanger	Angergasse/Dr.-Plochl-Straße
7	Kadettengasse	Kadettengasse/Puntigamerstraße
8	Felix-Dahn-Platz	Felix-Dahn-Platz
9	Dominikanergrund	Hafnerriegel/Münzgrabenstraße
10	Harmsdorfpark	Harmsdorfgasse/Neufeldweg
11	Eichenweg	Eichenweg/Petrifelderstraße
12	St.-Peter-Pfarrweg	Schauensteingasse
13	Hasnerplatz	Hasnerplatz
14	Martha-Tausk-Park	Lehargasse/Th.-Körner-Straße
15	Schwimmschulkai	Schwimmschulkai 88
16	Th.-Körner-Straße	Th.-Körner-Straße Nr. 160
17	Ziegelstraße	Ziegelstraße nach Haus Nr. 17
18	Stadtspark	Sauraugasse
19	August-Matthey-Park	Merangasse/Schillerstraße
20	Lessingpark	Lessingstraße/Naglergasse
21	Hilmteich	Hilmteich
22	Rosenhain	Panoramagasse 50
23	Concordia	Ragnitzbach/Bezirkssportplatz
24	Am Fröbelpark	Am Fröbelpark
25	Marienwiese	Darmstadtgasse/Trondheimgasse
26	Augasse	Augasse 116-118
27	Fischerau	Augasse 81/Fischeraustraße
28	Ekkehard-Hauer-Str.	Ekkehard-Hauer-Straße 3-29
29	Grottenhofstraße	Grottenhofstraße 28-74
30	Wachtelgasse	Arnetzgasse/Wachtelgasse
31	Schererstraße	Schererstr./Straßgangerstr.
32	Grillweg	Grillweg/Kärntner Straße
33	Nippelgasse	Nippelgasse 6-10
34	Dornschneidergasse	Dornschneidergasse
35	Dr.-Hans-Spitzky-Pl.	Auf der Tändelwiese
36	Josef-Huber-Park	Josef-Huber-Gasse 26
37	Karlauergürtel	Karlauergürtel/Lazarettgürtel
38	Oeverseepark	Oeverseegasse/Lissagasse
39	St. Johannes Park	Hammer-Purgstall-Gasse
40	St. Lukas	Eggenberger Gürtel/Grasweg
41	Konsumwiese	Dreischützengasse/W.-Biro-Straße
42	Metahofpark	Babenbergerstraße/Metahofgasse
43	Volksgarten	Volksgartenstraße
44	Junges Europa	Krausgasse/Vinzenzgasse
45	Pfarrer-Schröttner	Pfarrer-Schröttner-Pl.

Tabelle 1: Adressen der öffentlichen Grazer Spielplätze mit Sandspielplatz

2.2 Probenentnahme

Um repräsentative, vergleichbare Sandproben zu erhalten, wurde in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation der MUG eine standardisierte Methodik für die Probenentnahme erarbeitet, die an jedem Sandspielplatz angewendet wurde.



Abbildung 4: Probenentnahme

Am 15. und 16. Juli 2013 wurden zwischen 6 und 10 Uhr die Sandproben entnommen. Mit Hilfe eines Kunststoffnetzes mit einer Maschenweite von 1m wurde ein Meter-Raster über den zu beprobenden Sandspielplatz gelegt, an jeder Schnittstelle dieses Rasters wurde mit einer Messschaufel eine definierte Menge Sand (2cm^3) aus 3cm Tiefe entnommen. Alle Einzelproben wurden zu einer Sammelprobe vereinigt, gekühlt und innerhalb von vier Stunden ins mikrobiologische Labor zur Weiterverarbeitung gebracht.

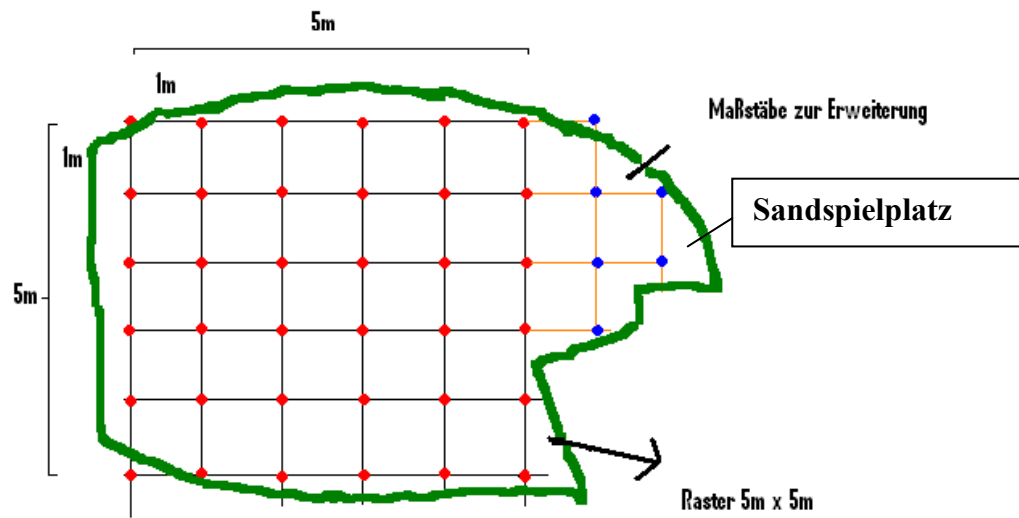


Abbildung 5: Schema Probenentnahme im Meterraster

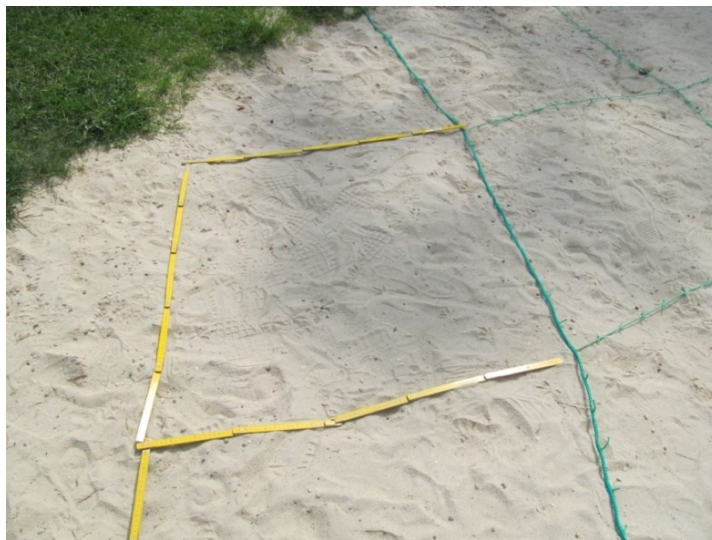


Abbildung 6: Meterraster

Mit folgendem Protokoll wurden die beprobten Spielplätze hinsichtlich unterschiedlicher Parameter charakterisiert:

Protokoll Spielplätze Graz

Spielplatz Nr.:

ROUTE

Adresse:

Team	
Datum, Uhrzeit	
Foto Sandplatz	
Witterung	<input type="checkbox"/> sonnig <input type="checkbox"/> bewölkt <input type="checkbox"/> regnerisch
Einzäunung	<input type="checkbox"/> ja, welche: <input type="checkbox"/> nein
Wasserhabitat in gleicher Anlage	<input type="checkbox"/> ja, Entfernung: <input type="checkbox"/> nein
Beschattung	<input type="checkbox"/> nicht <input type="checkbox"/> teilweise <input type="checkbox"/> ganz
Zustand	<input type="checkbox"/> sehr gepflegt <input type="checkbox"/> gepflegt <input type="checkbox"/> kaum gepflegt
Verunreinigungen (Tierkot)	<input type="checkbox"/> ja, Anzahl: Art: <input type="checkbox"/> nein
Zustand des Sandes	<input type="checkbox"/> trocken <input type="checkbox"/> feucht <input type="checkbox"/> nass
Wasserspielmöglichkeit Sandplatz	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Temperatur Luft (Schatten)	
Temperatur Sand	
Anzahl Einzelproben	

Skizze Sandplatz:

Tabelle 2: Spielplatzprotokoll

2.3 Weiterverarbeitung im mikrobiologischen Labor

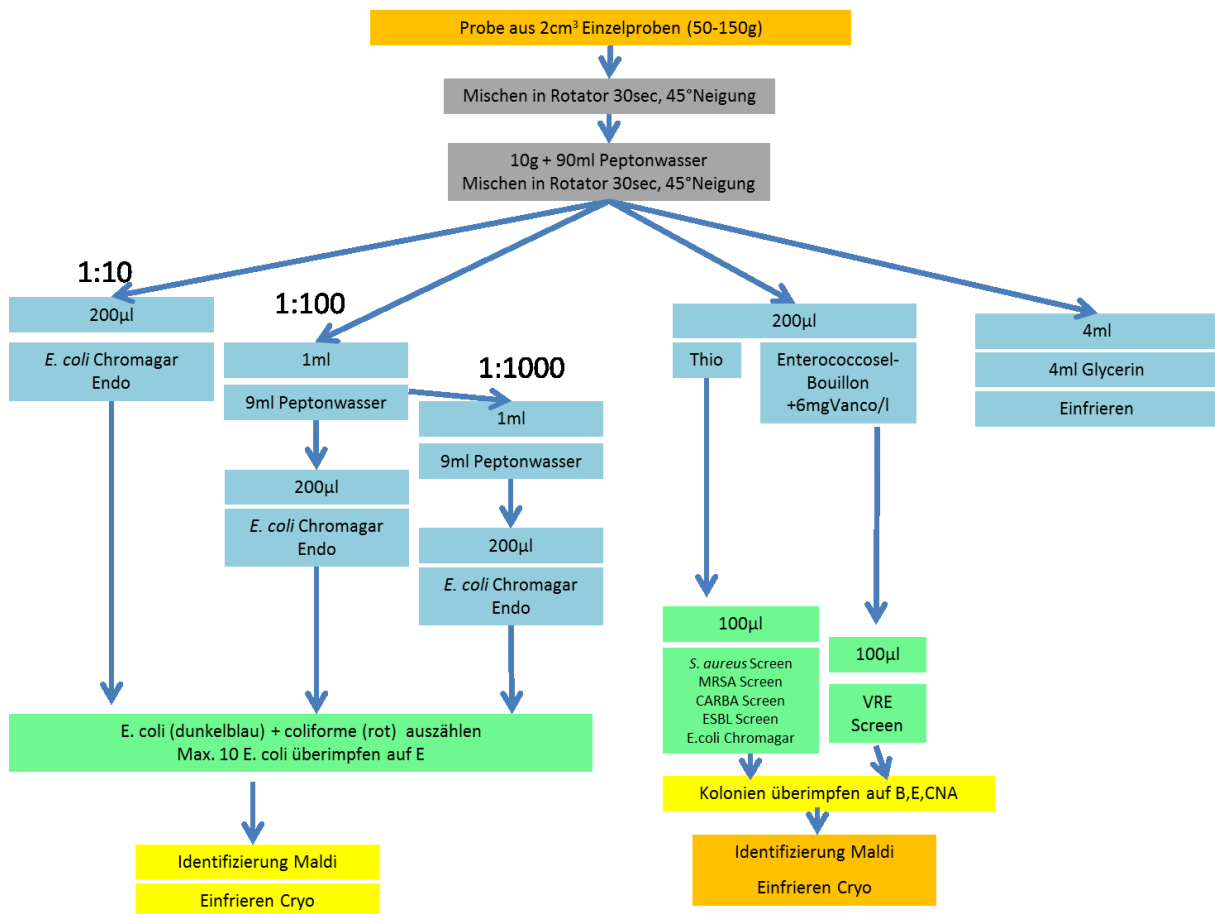


Abbildung 7: Probenverarbeitung im mikrobiologischen Labor

Die Sandproben wurden im Labor mittels ROTATOR GENIE™ (SI, New York) homogen durchmischt. In Vorversuchen wurden die optimalen Geräteeinstellungen zur Durchmischung bestimmt: 30s bei 45°Plattformneigung.



Abbildung 8: Rotator

2.3.1 Sandfeuchtebestimmung

Von den Sandproben wurden unmittelbar nach dem Mischen ca. 40g in vorher abgewogene Stuhl-Überhüllen eingewogen. Danach wurden die offenen Hüllen bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz (24 Stunden) getrocknet. Zum Schutz gegen Kontamination wurden die Hüllen mit Papiertüchern abgedeckt. Nach dem Trockenvorgang wurden die Hüllen nach ca. 15 Minuten Abkühlzeit wieder gewogen.

Berechnung: Feuchtegehalt $F = \frac{(G_f - G_l) - (G_t - G_l)}{G_f - G_l} \cdot 100$

G_f Gewicht Sand feucht

G_l Gewicht Hülle leer

G_t Gewicht Sand trocken

2.3.2 Verwendete Nährsubstrate

1) Nährböden (Universal- und Selektivmedien)

Endoagar (Oxoid)	Zur selektiven Anzucht von gramnegativen Stäbchen, insbesondere Enterobakterien. ²⁴
Blutagar (Oxoid)	Zur Anzucht von grampositiven und gramnegativen Bakterien
Columbia-CNA (bioMérieux)	Zur Anzucht von grampositiven Bakterien
COLI/Coliforme (Merck)	Selektives und chromogenes Medium zur Identifikation und Quantifizierung von <i>E. coli</i> und anderen Coliformen ²⁵
SAID (bioMérieux)	Selektivmedium zum Screening auf <i>S. aureus</i>
MRSA (bioMérieux)	Selektivmedium zum Screening auf Methicillin-resistente <i>S. aureus</i> Stämme (MRSA) ²⁶
CARBA (bioMérieux)	Selektivmedium zum Screening auf Carbapenemase - bildende Enterobakterien. <i>E. coli</i> färben sich rosa bis dunkelrot, <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> färben sich grünblau bis braungrün. <i>Proteeae</i> färben sich dunkel bis hellbraun ²⁷

(24) bioMérieux Deutschland 2013

(25) Bundesministerium für Gesundheit 2011

(26) bioMérieux Deutschland 2013

(27) Vgl.ebd..

ESBL (bioMérieux)	Selektivmedium zum Screening auf ESBL - bildende Enterobakterien; <i>E. coli</i> färben sich rosa bis dunkelrot, <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> färben sich grünblau bis braungrün. <i>Proteae</i> färben sich dunkel bis hellbraun ²⁸
VRE (bioMérieux)	Selektivmedium zum Nachweis von <i>E. faecium</i> (violett gefärbte Kolonien) und <i>E. faecalis</i> (blaugrün gefärbte Kolonien) mit erworbener Vancomycin-Resistenz (VRE) ²⁹

2) Anreicherungsmedien

Thioglycolat	Zur Anreicherung von anaeroben sowie aeroben Mikroorganismen ³⁰
Enterococcosel Bouillon (BD) + Vancomycin	Zur Anreicherung von Enterokokken mit erworbener Vancomycin-resistenz ³¹

(28) bioMérieux Deutschland 2013.

(29) Vgl.ebd.

(30) Heipha Diagnostika 2011

(31) BD 2006

2.3.3 Keimzahlbestimmung

Von jeder Probe wurden folgende Verdünnungen hergestellt:

- 1:10 Verdünnung: 10g Sand mit 90ml Peptonwasser
- 1:100 Verdünnung: 1ml aus der 1. Verdünnung mit 9ml Peptonwasser
- 1:1000 Verdünnung: 1ml aus der 2. Verdünnung mit 9ml Peptonwasser

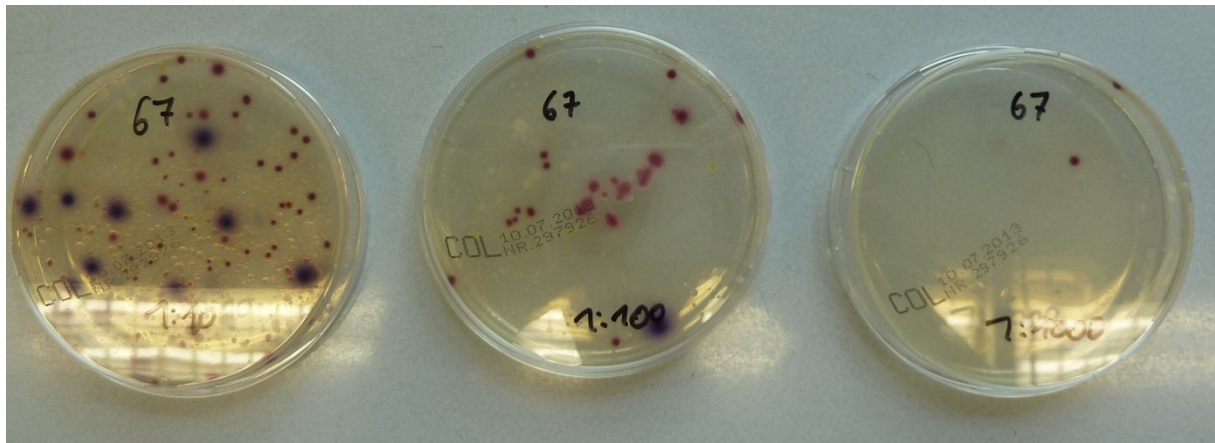


Abbildung 9: Verdünnungsreihe

Von allen Verdünnungen wurden 200µl auf COLI/Coliforme Agar und ENDO-Agar pipettiert und ausplattiert. Nach Bebrütungsdauer von 24h wurden *E. coli* sowie Coliforme - Kolonien ausgezählt. Von allen wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe sowie dem ausplattierten Volumen berechneten Keimzahlen der Mittelwert berechnet. (CFU/100g Sand). Außerdem wurde vom Anreicherungsmedium nach 24h Bebrütungsdauer auf das Vorhandensein von *E. coli* bzw. coliformen Keimen untersucht. Bei positivem Nachweis wurde die Keimzahl mit „nach Anreicherung“ protokolliert. Von jeder Probe wurden maximal 10 morphologisch unterschiedliche *E. coli* Kolonien weiter überimpft sowie maximal fünf coliforme Keime.

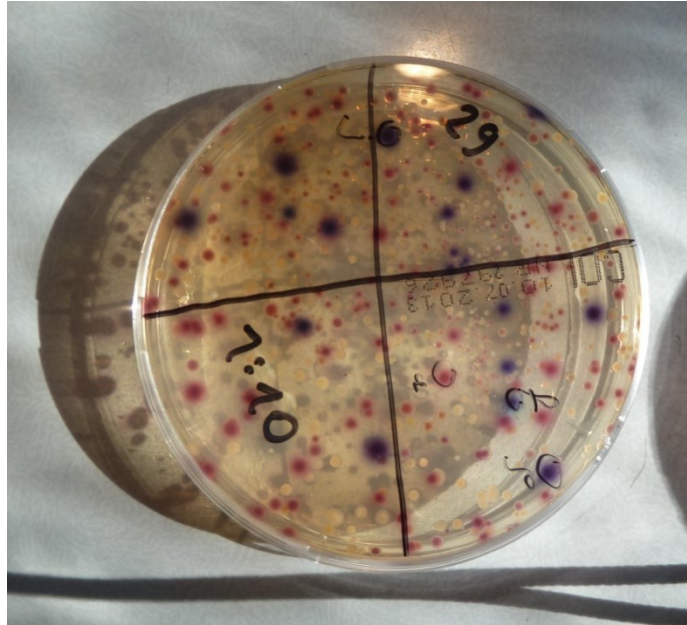


Abbildung 10: Wachstum auf COLI/Coliforme Agar

2.3.4 Screening auf multiresistente Erreger

200µl der 1:10 Verdünnung wurden in die flüssigen Anreicherungsmedien Thioglycolat und Enterococcosel-Bouillon + 6mg Vanco/l eingerührt, 24 Stunden bebrütet und auf selektive Nährmedien zum Nachweis von *S. aureus*, MRSA, VRE, Carbapenemase- und ESBL- bildenden Enterobakterien weiter überimpft (siehe Schema).

2.3.5 Identifizierung der Bakterienisolate

Die Identifizierung der Bakterienisolate erfolgte routinemäßig mittels MALDI-TOF. Nicht eindeutige Ergebnisse von gramnegativen Stäbchen wurden mittel Vitek 2 (BioMerieux) (GN – Identifizierungskarte) überprüft.

MALDI-TOF MS ist ein matrix-unterstützter Laser-Desorptions-/Ionisations Massenspektrometer, welches Material aus mikrobiellen Kulturen zur Identifizierung eines Keims analysiert. MALDI-TOF identifiziert Mikroorganismen durch Massenspektrometrie - einem Analyseverfahren, das die Auftrennung ionisierter Teilchen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis ermöglicht. Mikrobielle Proben werden anhand der Bewegungsdynamik von Partikeln analysiert, die durch einen

Laserimpuls in einer Vakuumröhre beschleunigt werden. Das resultierende Spektrum der Massenverteilung wird anhand einer Wissensdatenbank interpretiert, die von bioMérieux entwickelt wurde.³² Die Vitek 2-GN-Identifizierungskarte ist zum einmaligen Gebrauch vorgesehen und basiert auf etablierten biochemischen Methoden und neu entwickelten Substraten, mit denen die Verwertung der Kohlenstoffquelle, enzymatische Aktivitäten oder Resistenzverhalten gemessen werden. Die Karte enthält 47 biochemische Tests und eine Kammer zur Negativkontrolle, die Endergebnisse stehen spätestens nach 10 Stunden zur Verfügung.³³

2.3.6 Resistenztestung der Bakterienisolate

Agardiffusion:

Der Agardiffusionstest bzw. Plättchendiffusionstest dient zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien. Die Durchführung sowie Ergebnisinterpretation erfolgte nach EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) Richtlinien.³⁴

Bei der Agardiffusion wird der zu testende Erreger auf ein festes Kulturmedium aufgebracht, anschließend werden kleine Filterpapierplättchen aufgelegt, die mit einer definierten Menge des zu testenden Antibiotikums getränkt sind. Das Antibiotikum diffundiert in den Agar, wobei sich ein Konzentrationsgefälle ergibt, welches über Nacht inkubiert wird. Bei Wachstumshemmung stellt sich um das Testplättchen eine wachstumsfreie Zone (Hemmhof) dar. Im Randbereich des Hemmhofs entspricht die Konzentration des Antibiotikums der minimalen Hemmhofkonzentration. (MHK). Der Durchmesser des Hemmhofs korreliert mit der MHK des Antibiotikums.³⁵

(32) Springer Medizin 2010

(33) bioMérieux Deutschland 2013

(34) EUCAST 2009

(35) Suerbaum et al. 2012

Resistenzstempel	Abkürzung	Antibiotikum	sensibel ≥ (mm)	resistent < (mm)
I	AM 10	Ampicillin	14	14
	AMC 30	Amoxicillin/Clavulansäure	17	17
	CN 30	Cefalexin	12	12
	CXM 30	Cefuroxim	18	18
	FOX 30	Cefoxitin	19	19
	CTX 5	Cefotaxim	20	17
II	CL 10	Colistin	-	-
	TZP 36	Piperacillin/Tazobactam	18	15
	MFX 5	Moxifloxacin	20	17
	CIP 5	Ciprofloxacin	22	19
	SXT	Trimethoprim/Sulfamethoxazol (Cotrimoxazol)	16	13
	GM 10	Gentamicin	17	14
III	AN 30	Amikacin	16	13
	MEM 10	Meropenem	22	16
	IPM 10	Imipenem	22	16
	FEP 30	Cefepim	24	21
	CAZ 10	Ceftazidim	22	19
	TGZ 15	Tigecyclin	18	15

Tabelle 3: Antibiotikastempel mit den getesteten Substanzen für *Enterobacteriaceae*

Resistenztestung mittels Vitek 2:

Zusätzlich zur Agrardiffusion wurde eine vollautomatische Resistenztestung mittels Vitek 2-AST-Karten mit der Nummer N196 für gramnegative Bakterien verwendet.³⁶:

Die Vitek 2 Resistenztestkarte (AST) wird zusammen mit dem Vitek 2 System zur automatischen quantitativen oder qualitativen Empfindlichkeitsprüfung von unter anderem aeroben gramnegativen Bakterien eingesetzt. Isolierte Kolonien werden von einer Agar-Kultur ausgewählt und auf ihre Empfindlichkeit getestet. Anschließend werden die Tests ausgewertet und die minimale Hemmkonzentration (MHK) wird bestimmt, dieses MHK gibt dem Arzt in der Regel Aufschluss über die Konzentration eines Antibiotikums, welche für eine Therapie nötig ist.³⁷

Folgende Antibiotika wurden hinsichtlich ihrer Wirksamkeit getestet:

Ampicillin	Ceftazidim	Fosfomycin
Amox/Clav	Cefepime	Ciprofloxacin
Pip/Tazo	Aztreonam	Moxifloxacin
Cefuroxim	Imipenem	Tigecyclin
Cefuroxim – Axetil	Meopenem	Trim/Sulfa
Cefoxitin	Gentamicin	
Cefotaxim	Amikacin	

Tabelle 4: Vitek 2 AST Karte N196

(36) bioMérieux Deutschland 2013

(37) bioMérieux Deutschland 2013.

3 Ergebnisse

3.1 Spielplatzbeschreibung

In der Stadt Graz gibt es insgesamt 72 öffentliche Spielplätze im Zuständigkeitsbereich der Holding Graz, davon verfügten zum Zeitpunkt der Beprobung 45 Spielplätze über einen Sandspielplatz. Diese 45 Sandspielplätze wurden für die vorliegende Studie mikrobiologisch untersucht und hinsichtlich abiotischer Parameter charakterisiert.

Kategorisierung der beprobten Spielplätze:

ANZAHL		PROZENT	
Witterung	Bewölkt	20	44,4%
	Sonnig	25	55,6%
Einzäunung	Nein	21	46,7%
	Ja	24	53,3%
Wasserhabitat	Nein	37	82,2%
	Ja	8	17,8%
Wasserspielplatz	Nein	37	82,2%
	Ja	8	17,8%
Beschattung	Nein	7	15,6%
	Ja	38	84,4%
Verunreinigung	Nein	35	77,8%
	Ja	10	22,2%
Zustand	1 sehr gepflegt	11	24,4%
	2 gepflegt	23	51,1%
	3 kaum gepflegt	11	24,4%

Tabelle 5: Beschreibung Spielplätze I

Oben angefügte Tabelle stellt die Ergebnisse der abiotischen Parameter der Spielplätze dar, die im Zuge der Beprobung erhoben wurden. Zusätzlich wurden Luft- und Sandtemperatur gemessen, die Feuchtwerte der Sandproben wurden gravimetrisch im Labor bestimmt.

	MITTELWERT	STANDARDABWEICHUNG	MEDIAN	MIN.	MAX.
Lufttemperatur (°C)	19	3	19	15	25
Sandtemperatur (°C)	18	2	18	16	22
Wassergehalt %	3,41	2	2,80	0,36	8,82

Tabelle 6: Beschreibung Spielplätze II

3.2 Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien

3.2.1 Vorhandensein von *E. coli* und coliformen Bakterien

<i>E. coli</i>	Nein	23	51,1%
	Ja	22	48,9%
Coliforme	Nein	1	2,2%
	ja	44	97,8%

Tabelle 7: Vorhandensein von *E. coli* und Coliforme

E. coli konnte in 22 von 45 Spielplatzproben nachgewiesen werden, coliforme Bakterien in 44 von 45 Spielplatzproben.

3.2.2 Arten der coliformen Bakterien

ARTEN	HÄUFIGKEIT DES VORKOMMENS IN SANDPLÄTZEN
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	18
<i>Serratia fonticola</i>	7
<i>Enterobacter amnigenus</i>	7
<i>Serratia marcescens</i>	4
<i>Citrobacter braaki</i>	4
<i>Escherichia vulneris</i>	3
<i>Citrobacter freundii</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Citrobacter youngae</i>	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
<i>Citrobacter werkmanii</i>	1

Tabelle 8: Vorkommen coliformer Keime

Am häufigsten wurden Enterobacter – Arten nachgewiesen, die zur Gruppe des *E. cloacae* complex gehören und biochemisch nur schwer auf Speziesebene zu identifizieren sind.

3.2.3 Keimzahlen

	Mittelwert	Standard- Abweichung	Median	Min.	Max.
Keimzahl <i>E. coli</i> CFU/100g	28568	26895	25500	n.A.	97500
Keimzahl Coliforme CFU/100g	466648	559220	297500	n.A.	3183333

Tabelle 9: Errechnete Keimzahlen (n.A. = nach Anreicherung)

Innerhalb der Spielplätze mit positivem Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien schwankten die errechneten Keimzahlen deutlich. In oberer Tabelle sind Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum für beide Gruppen dargestellt.

Die im Folgenden dargestellten Diagramme und Tabellen auf Basis der statistischen Auswertung mittels SPSS Version 20 wurden am Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation der MUG erstellt.

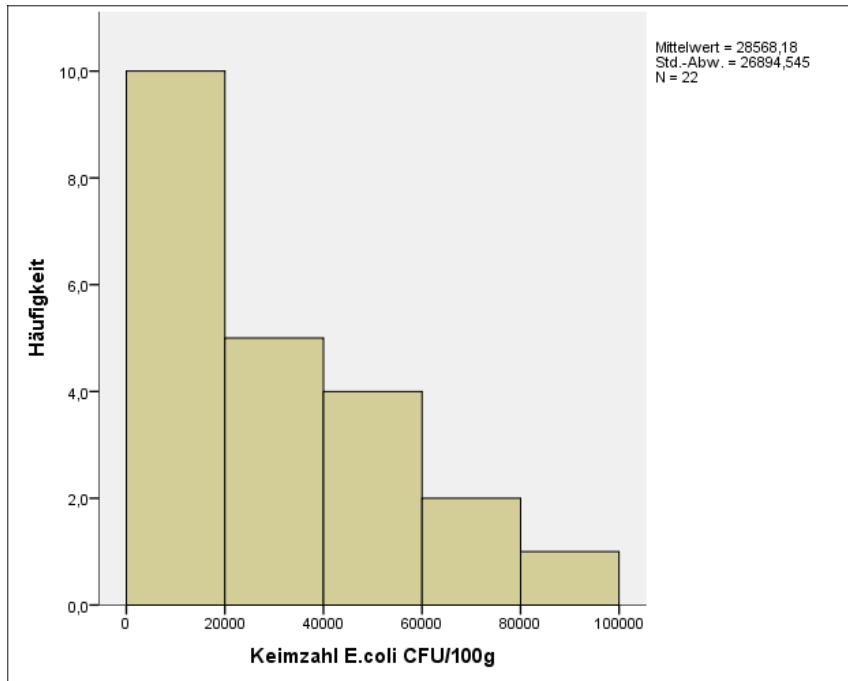


Abbildung 11: Häufigkeit Keimzahl *E. coli*

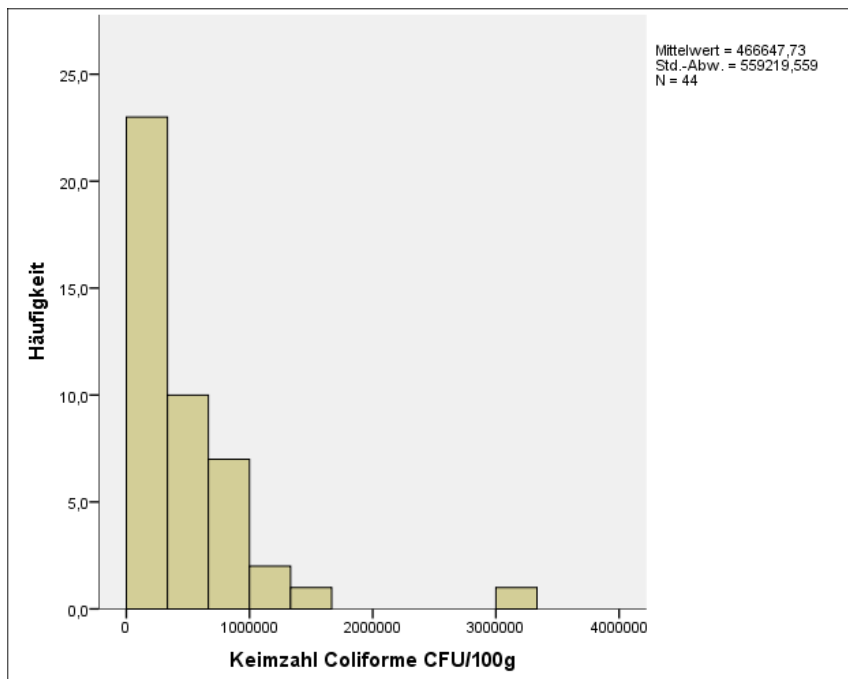


Abbildung 12: Häufigkeit Keimzahl Coliforme

3.2.4 Korrelationen Keimzahlen – abiotische Parameter

Folgende Darstellungen zeigen die Verteilungen der erhobenen Keimzahlen in Abhängigkeit von der Ausprägung der einzelnen abiotischen Faktoren. Die Darstellungen erfolgen sowohl für die Keimzahlen von *E. coli* als auch für die Keimzahlen der coliformen Bakterien.

1) *E. coli*

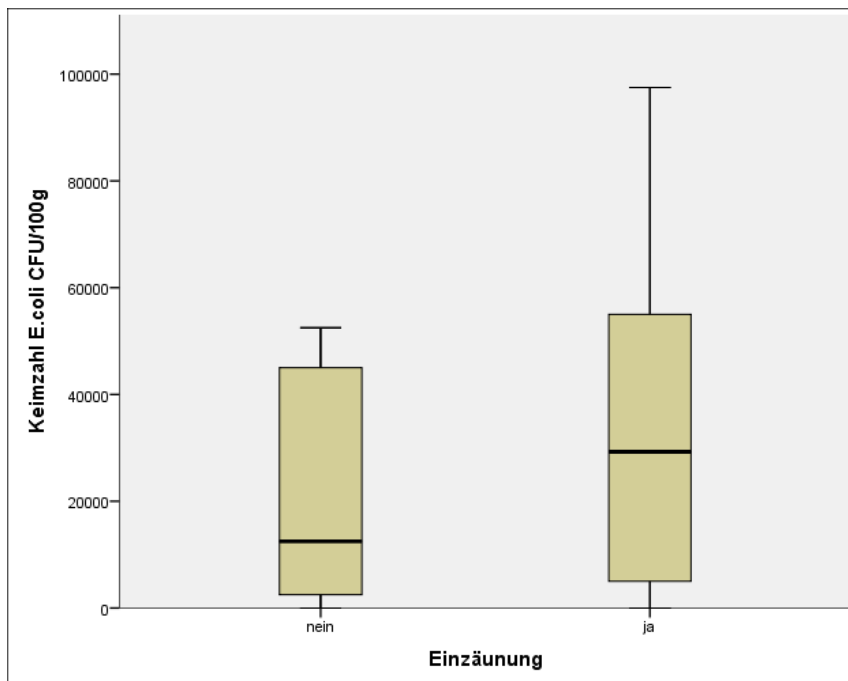


Abbildung 13: Keimzahlen *E. coli* (Einzäunung)

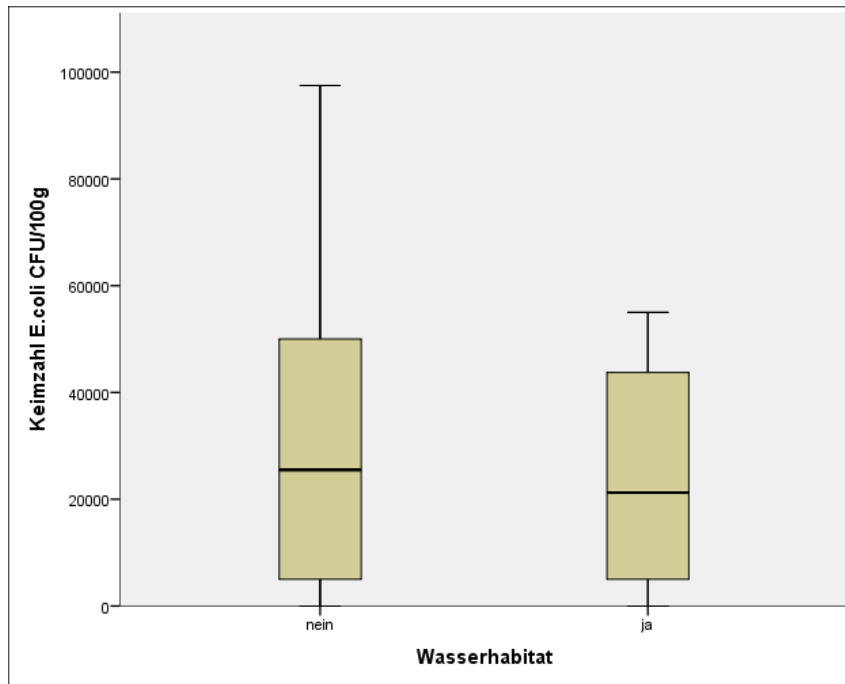


Abbildung 14: Keimzahlen *E. coli* (Wasserhabitat)

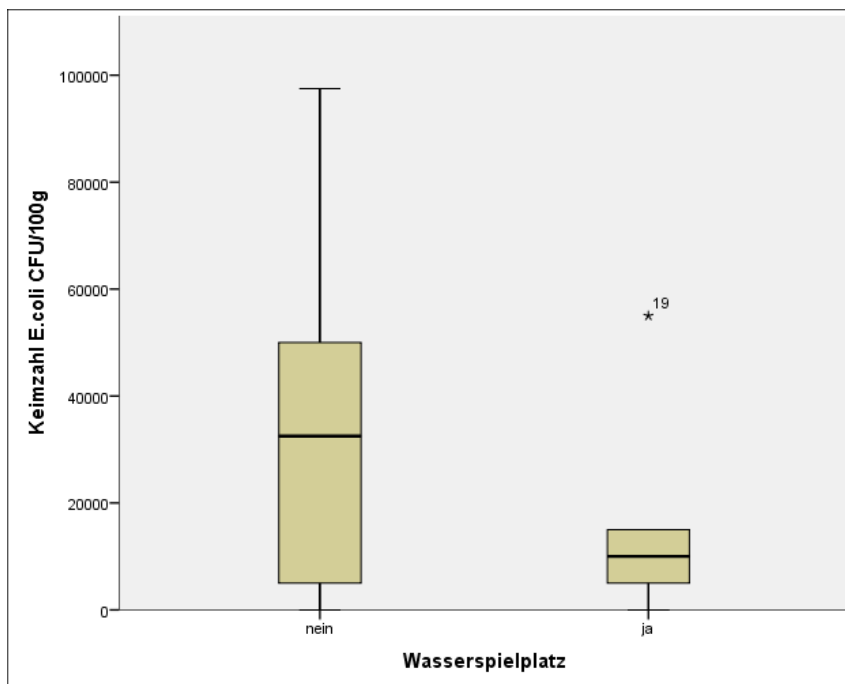


Abbildung 15: Keimzahlen *E. coli* (Wasserspielplatz)

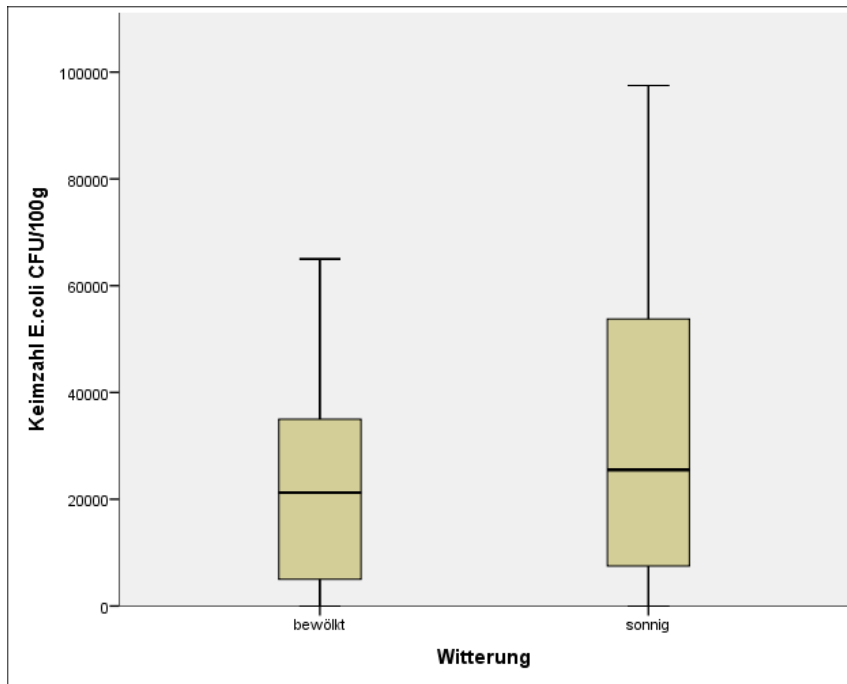


Abbildung 16: Keimzahlen *E. coli* (Witterung)

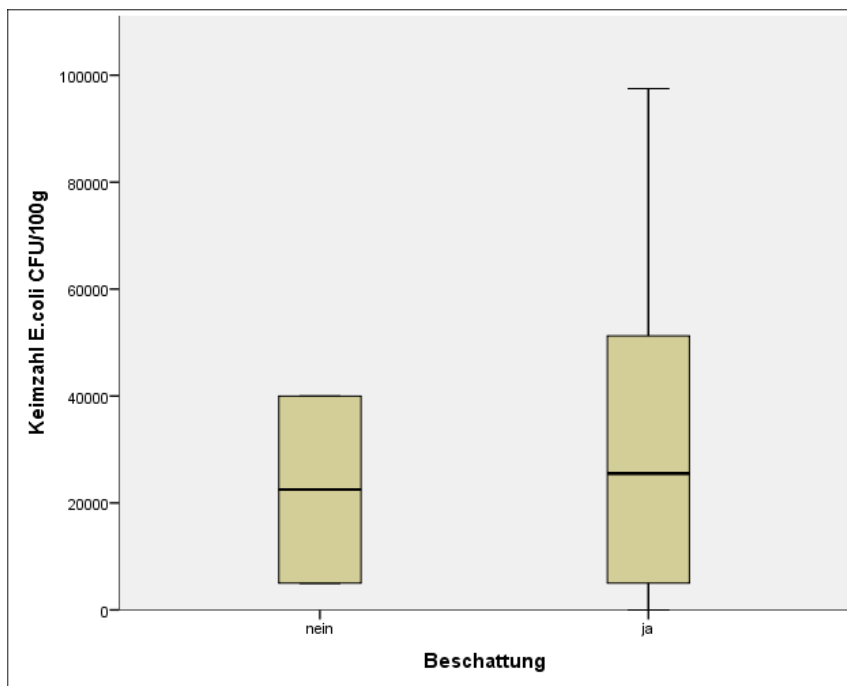


Abbildung 17: Keimzahlen *E. coli* (Beschattung)

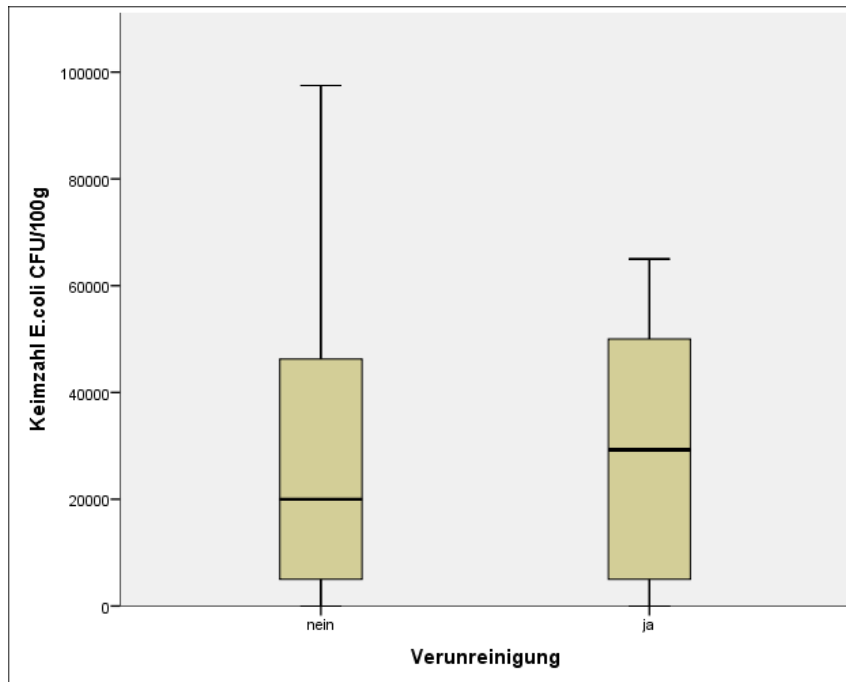


Abbildung 18: Keimzahlen *E. coli* (Verunreinigung)

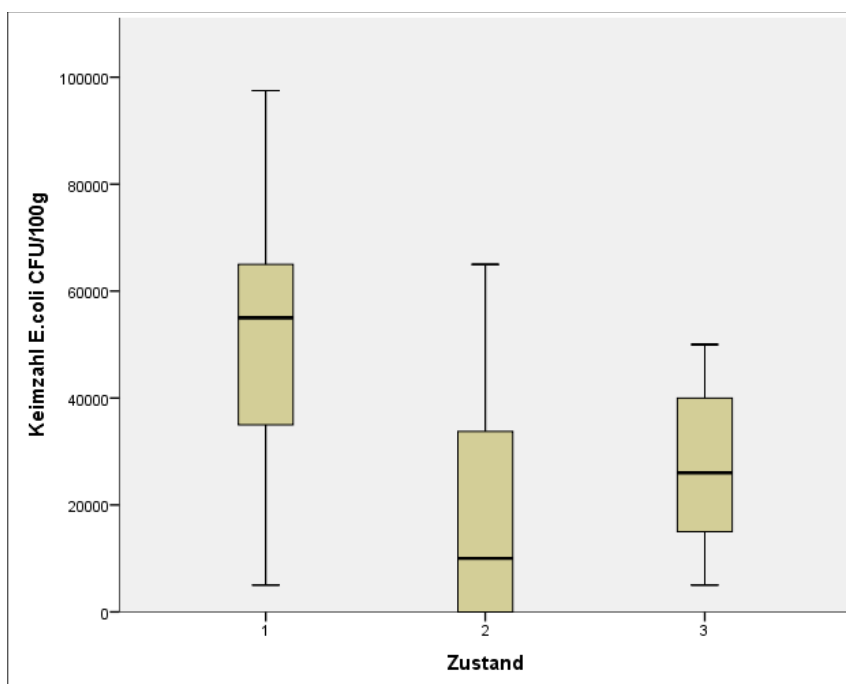


Abbildung 19: Keimzahlen *E. coli* (Zustand)

Die Keimzahlenbereiche für *E. coli* schwanken innerhalb der Spielplätze und innerhalb der unterschiedlichen Parameterausprägungen. Es lässt sich kein eindeutiger Schluss für einen Zusammenhang zwischen den Keimzahlen und den

Parametern Einzäunung, Wasserhabitat, Wasserspielplatz, Witterung, Beschattung, Verunreinigung und Zustand ableiten.

2) Coliforme Bakterien

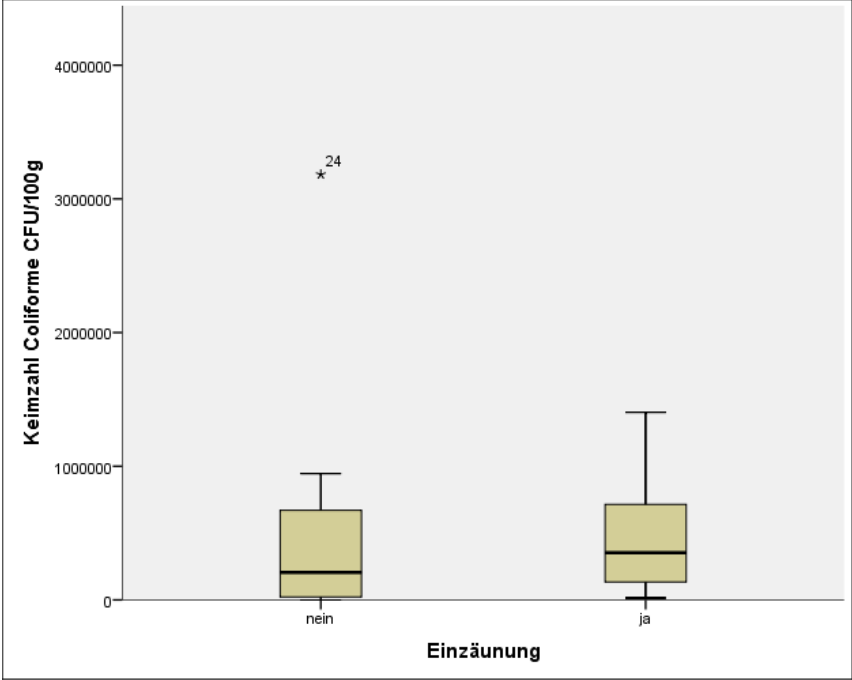


Abbildung 20: Keimzahlen Coliforme (Einzäunung)

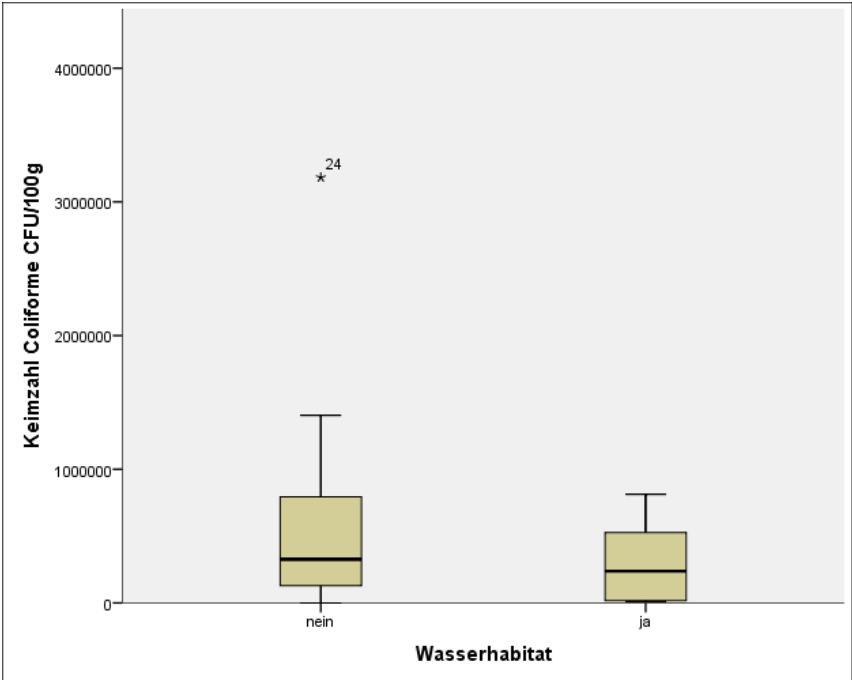


Abbildung 21: Keimzahlen Coliforme (Wasserhabitat)

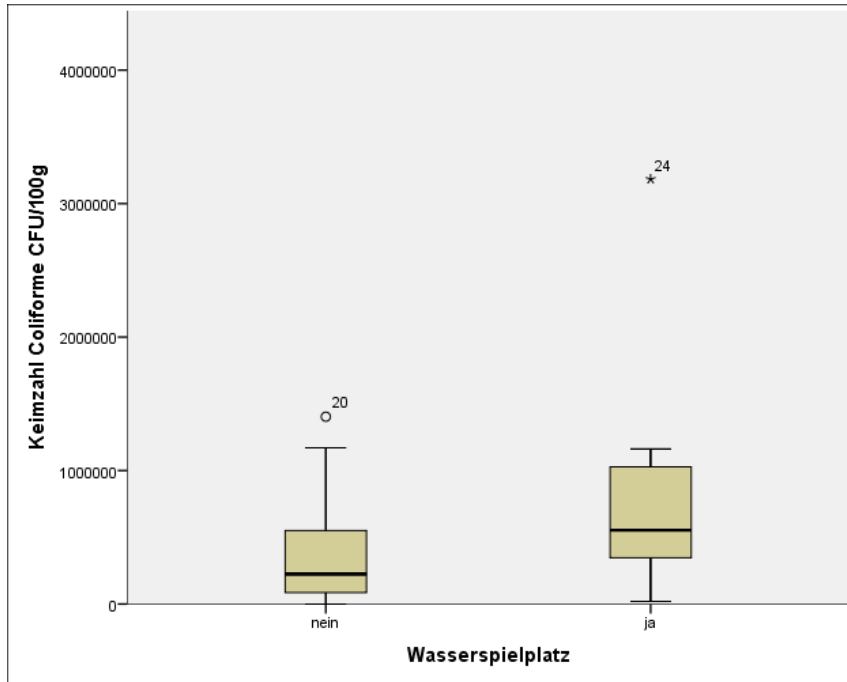


Abbildung 22: Keimzahlen Coliforme (Wasserspielplatz)

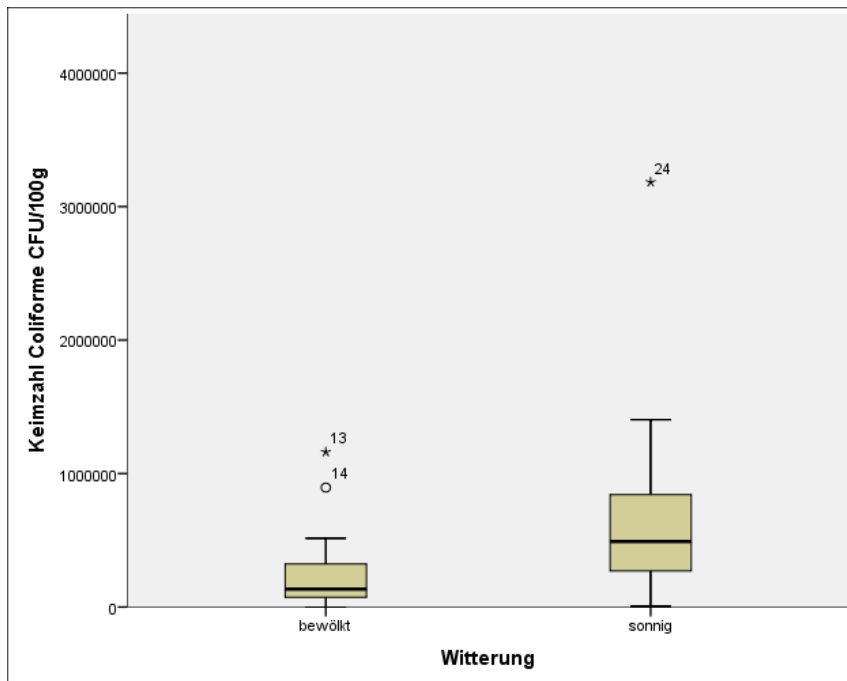


Abbildung 23: Keimzahlen Coliforme (Witterung)

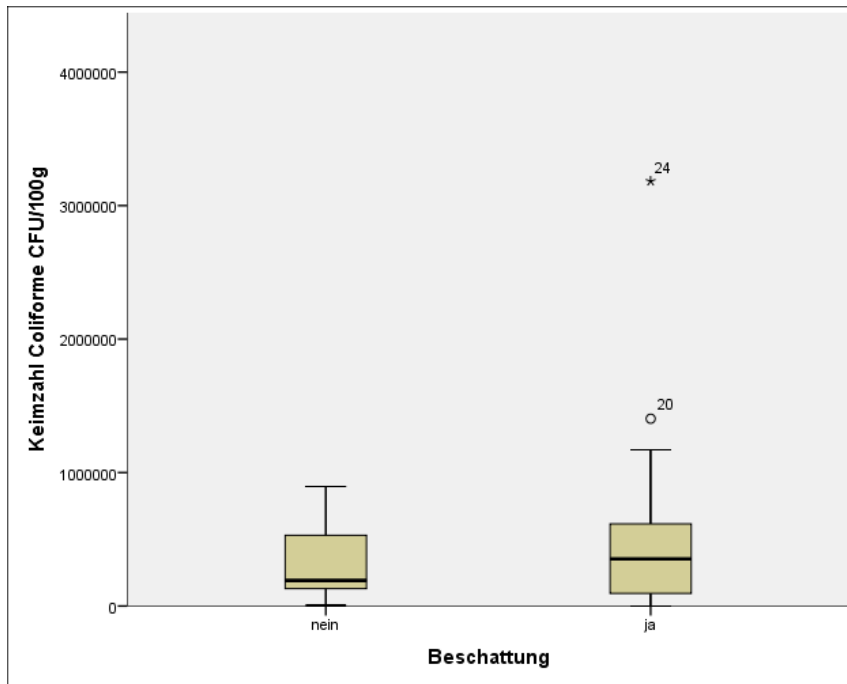


Abbildung 24: Keimzahlen Coliforme (Beschattung)

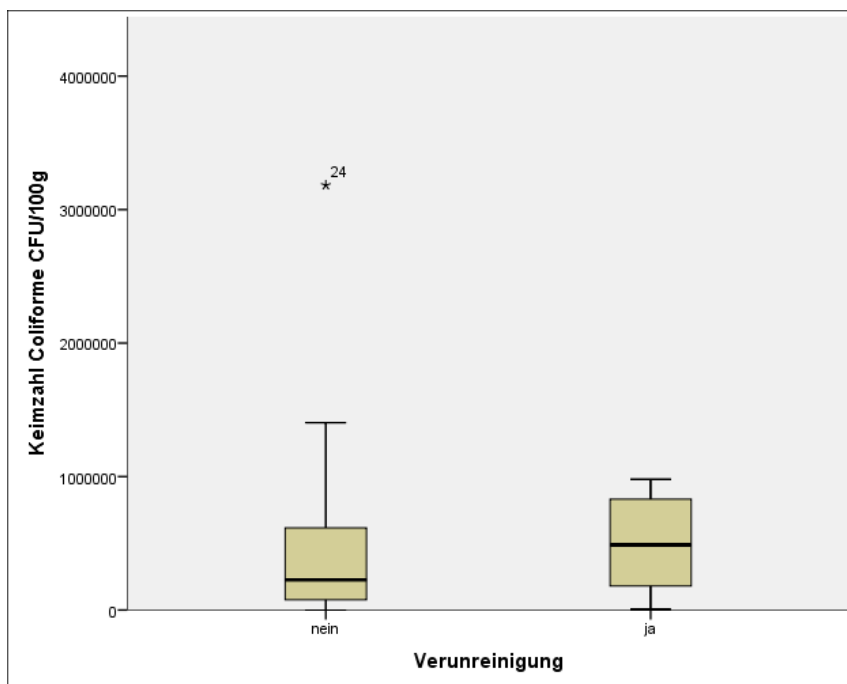


Abbildung 25: Keimzahlen Coliforme (Verunreinigung)

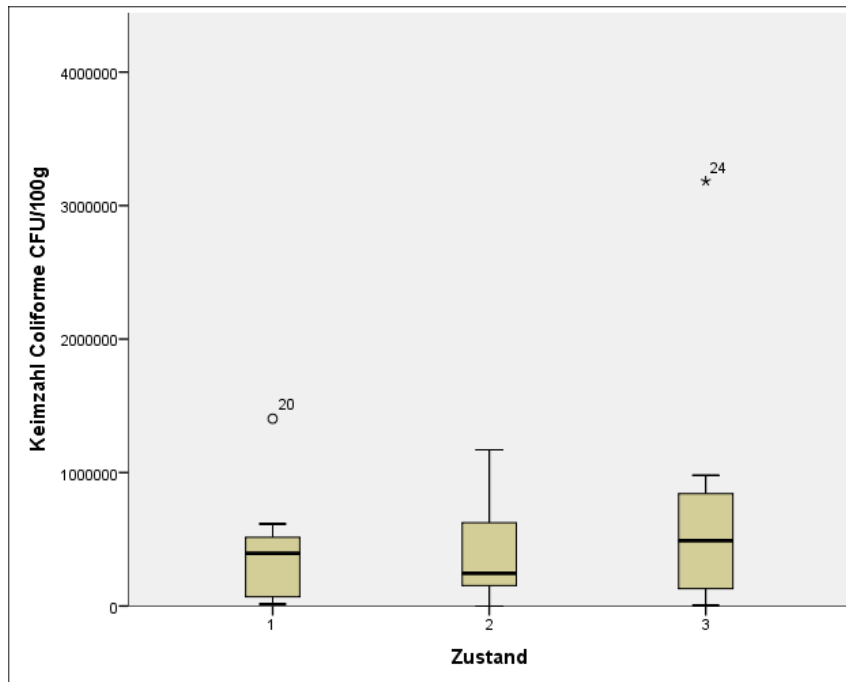


Abbildung 26: Keimzahlen Coliforme (Zustand)

Auch die Keimzahlen der coliformen Bakterien zeigen keinen deutlichen Zusammenhang mit gewissen abiotischen Paramterausprägungen. Die Keimzahlen schwanken innerhalb der einzelnen Gruppen.

3.2.5 Korrelationen Keimnachweis – abiotische Parameter

Folgende Kreuztabellen zeigen die Zusammenhänge zwischen dem Nachweis von *E. coli* (qualitativ) und den Ausprägungen der erhobenen abiotischen Parameter. Diese Auswertungen wurden nur für *E. coli* durchgeführt, da coliforme Bakterien mit Ausnahme von einem Spielplatz in allen nachgewiesen wurden und somit eine statistische Auswertung nicht sinnvoll ist.

			<i>E. coli</i>		Gesamt
			nein	ja	
Einzäunung	nein	Anzahl	13	8	21
		% innerhalb von Einzäunung	61,9%	38,1%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	56,5%	36,4%	46,7%
	ja	Anzahl	10	14	24
		% innerhalb von Einzäunung	41,7%	58,3%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	43,5%	63,6%	53,3%
Gesamt	Anzahl		23	22	45
	% innerhalb von Einzäunung		51,1%	48,9%	100,0%
	% innerhalb von <i>E. coli</i>		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 10: Kreuztabelle Einzäunung *E. coli*

			<i>E. coli</i>		Gesamt
			nein	ja	
Wasserhabitat	nein	Anzahl	19	18	37
		% innerhalb von Wasserhabitat	51,4%	48,6%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	82,6%	81,8%	82,2%
	ja	Anzahl	4	4	8
		% innerhalb von Wasserhabitat	50,0%	50,0%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	17,4%	18,2%	17,8%
Gesamt	Anzahl		23	22	45
	% innerhalb von Wasserhabitat		51,1%	48,9%	100,0%
	% innerhalb von <i>E. coli</i>		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 11: Kreuztabelle Wasserhabitat *E. coli*

			<i>E. coli</i>		Gesamt
			nein	ja	
Wasserspielplatz	nein	Anzahl	20	17	37
		% innerhalb von Wasserspielplatz	54,1%	45,9%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	87,0%	77,3%	82,2%
	ja	Anzahl	3	5	8
		% innerhalb von Wasserspielplatz	37,5%	62,5%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	13,0%	22,7%	17,8%
Gesamt		Anzahl	23	22	45
		% innerhalb von Wasserspielplatz	51,1%	48,9%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 12: Kreuztabelle Wasserspielplatz *E. coli*

			<i>E. coli</i>		Gesamt
			nein	ja	
Beschattung	nein	Anzahl	5	2	7
		% innerhalb von Beschattung	71,4%	28,6%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	21,7%	9,1%	15,6%
	ja	Anzahl	18	20	38
		% innerhalb von Beschattung	47,4%	52,6%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	78,3%	90,9%	84,4%
Gesamt		Anzahl	23	22	45
		% innerhalb von Beschattung	51,1%	48,9%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 13: Kreuztabelle Beschattung *E. coli*

			<i>E. coli</i>		Gesamt
			nein	ja	
Verunreinigung	nein	Anzahl	19	16	35
		% innerhalb von Verunreinigung	54,3%	45,7%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	82,6%	72,7%	77,8%
	ja	Anzahl	4	6	10
		% innerhalb von Verunreinigung	40,0%	60,0%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	17,4%	27,3%	22,2%
Gesamt	Anzahl		23	22	45
	% innerhalb von Verunreinigung		51,1%	48,9%	100,0%
	% innerhalb von <i>E. coli</i>		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 14: Kreuztabelle Verunreinigung *E. coli*

			<i>E. coli</i>		Gesamt
			nein	ja	
Zustand	1	Anzahl	6	5	11
		% innerhalb von Zustand	54,5%	45,5%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	26,1%	22,7%	24,4%
	2	Anzahl	11	12	23
		% innerhalb von Zustand	47,8%	52,2%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	47,8%	54,5%	51,1%
	3	Anzahl	6	5	11
		% innerhalb von Zustand	54,5%	45,5%	100,0%
		% innerhalb von <i>E. coli</i>	26,1%	22,7%	24,4%
Gesamt	Anzahl		23	22	45
	% innerhalb von Zustand		51,1%	48,9%	100,0%
	% innerhalb von <i>E. coli</i>		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 15: Kreuztabelle Zustand *E. coli*

3.2.6 Korrelationen metrische Daten - Keimzahlen

Die Berechnung des Spearmans Rang-Korrelations-Koeffizienten für metrische Datenkorrelationen ergab für den berechneten Wassergehalt folgendes Ergebnis:

		<i>E. coli</i>	Coliforme
Wassergehalt %	Korrelationskoeffizient	,225	,509**
	Sig. (2-seitig)	,315	,000
	N	22	44

Tabelle 16: Korrelation Keimzahl-Wassergehalt

Die Korrelation zwischen der Keimzahl der coliformen Bakterien und dem Wassergehalt des Sandes ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

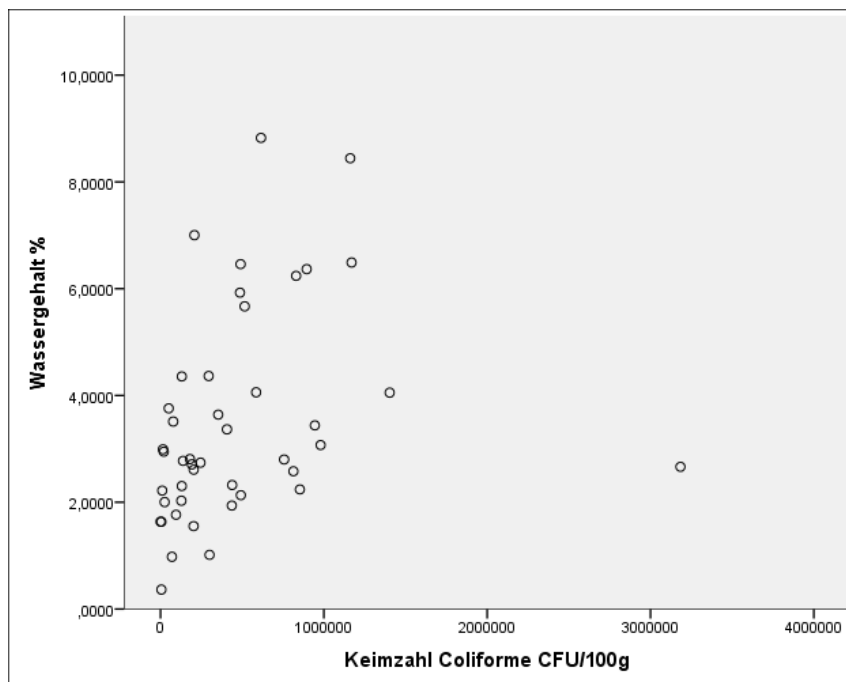


Abbildung 27: Korrelation Keimzahl-Wassergehalt Coliforme

3.3 Antibiotikaresistenz

3.3.1 Ergebnis der Resistenztestung für *E. coli*

Insgesamt wurden 96 *E. coli* Isolate auf ihr Resistenzverhalten untersucht. Die Resistenzraten für die getesteten Antibiotika sind in folgender Tabelle dargestellt. Die höchste Rate an nicht-empfindlichen Isolaten wurde für Ampicillin erhoben (12,5%). Weiters konnten intermediär-empfindliche oder resistente Isolate gegenüber Piperacillin (10,4%), Amoxicillin/Clavulansäure (9,4%), Trimethoprim/Sulfamethoxazol (6,3%), Tetracyclin (6,3%), Piperacillin/Tazobactam (5,2%), Naldixinsäure (4,2%), Cefuroxim-Axetil (3,1%), Cefoxitin (3,1%), Moxifloxacin (2,1%), Chloramphenicol (2,1%) und Ciprofloxacin (1%) detektiert werden. Es konnten keine ESBL- und Carbapenemase - bildenden *E. coli* Isolate nachgewiesen werden.

Resistenzraten <i>E. coli</i>				
Antibiotikum	%S	%I	%R	%R+I
AM-Ampicillin	87,5	0,0	12,5	12,5
AMC-Amoxicillin/Clavulansäure	90,6	0,0	9,4	9,4
AN-Amikacin	100,0	0,0	0,0	0,0
ATM-Aztreonam	100,0	0,0	0,0	0,0
CAZ-Ceftazidim	100,0	0,0	0,0	0,0
CIP-Ciprofloxacin	99,0	0,0	1,0	1,0
CTX-Cefotaxim	100,0	0,0	0,0	0,0
CXM-Cefuroxim	96,9	0,0	3,1	3,1
CXMA-Cefuroxim-Axetil	96,9	0,0	3,1	3,1
FEP-Cefepim	100,0	0,0	0,0	0,0
FOS-Fosfomycin	100,0	0,0	0,0	0,0
FOX-Cefoxitin	96,9	0,0	3,1	3,1
GM-Gentamicin	100,0	0,0	0,0	0,0
IPM-Imipenem	100,0	0,0	0,0	0,0
MEM-Meropenem	100,0	0,0	0,0	0,0
MXF-Moxifloxacin	97,9	0,0	2,1	2,1
SXT-Trimethoprim/Sulfamethoxazol	93,8	0,0	6,3	6,3
TGC-Tigecycline	100,0	0,0	0,0	0,0
TZP-Piperacillin/Tazobactam	94,8	4,2	1,0	5,2
TE-Tetrazyklin	93,8	1,0	5,2	6,3
C-Chloramphenicol	97,9	0,0	2,1	2,1
NA-Naldixinsäure	95,8	3,1	1,0	4,2
PIP-Piperacillin	89,6	2,1	8,3	10,4

Tabelle 17: Resistenzverhalten *E. coli*

Die Ergebnisse der MHK-Kategorienbestimmung für einzelne Antibiotika mittels Vitek 2 sowie Agardiffusion für die einzelnen Isolate sind in folgenden Tabellen dargestellt.

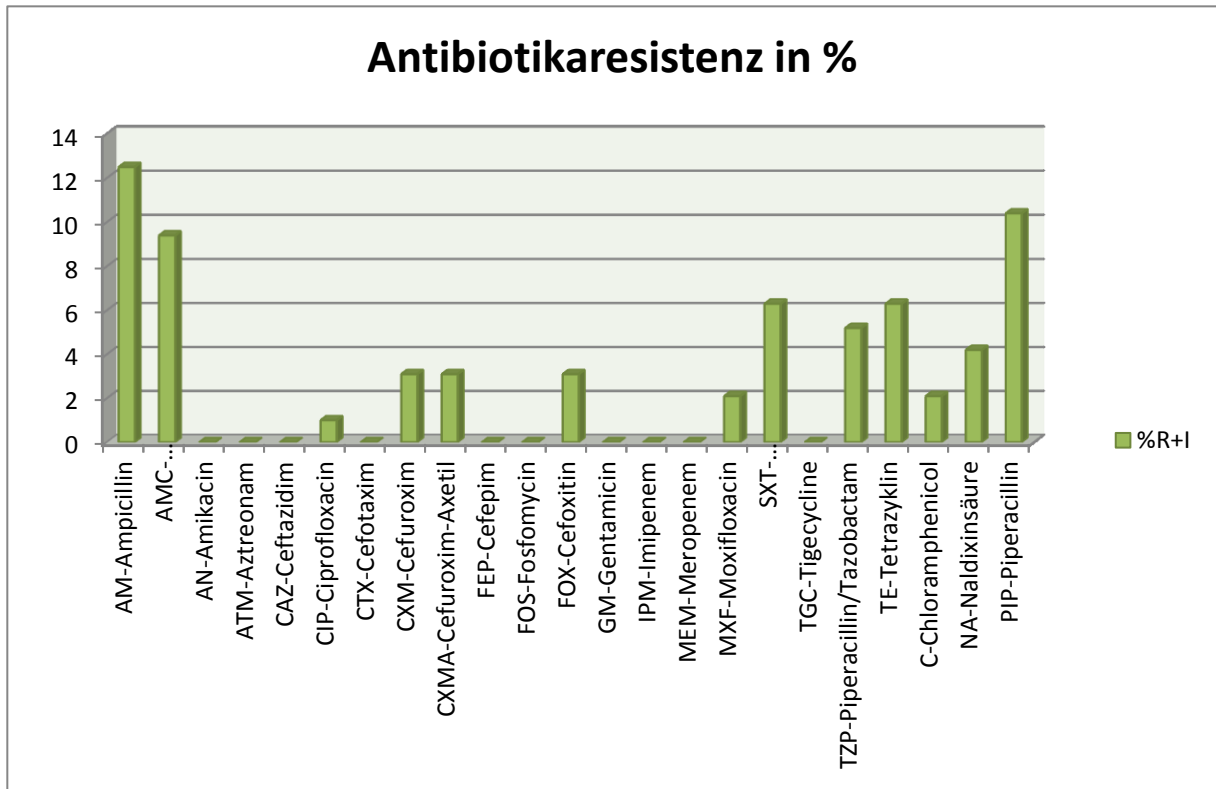


Diagramm 1: Antibiotikaresistenz in Prozent

3.4 Screening auf *S. aureus*

Es konnte aus einer Spielplatzsandprobe ein *S. aureus* Isolat angezüchtet werden. Die Resistenztestung für dieses Isolat ergab eine Unempfindlichkeit gegenüber Penicillin und Ampicillin, alle anderen ausgetesteten Antibiotika waren wirksam.

Der Spielplatz von dem dieses Isolat stammt, war eingezäunt und wurde als „gepflegt“ eingestuft. Verunreinigungen wie Müll oder tierische Exkrememente wurden zum Zeitpunkt der Beprobung nicht dokumentiert.

3.5 Screening auf multiresistente Erreger

Im Rahmen dieser Studie wurden alle Sandspielplatzproben auch auf das Vorhandensein multiresistenter Erreger gescreent. Es konnten keine Bakterien mit erworbener Multiresistenz nachgewiesen werden (VRE, MRSA, oder Carbapenemase- und ESBL- bildende Enterobakterien).

4 Diskussion

I. Allgemeines

Die Ziele vorliegender Arbeit waren eine Prävalenzerhebung von *E. coli* und coliformen Bakterien von öffentlichen Kindersandspielplätzen in der Stadt Graz und die Testung der Antibiotikaresistenz von den isolierten *E. coli* Stämmen. Im Rahmen dieser Studie wurden zum ersten Mal Sandspielplätze hinsichtlich dieser Fragestellungen untersucht, in der Literatur gibt es weder nationale noch internationale Vergleichsuntersuchungen.

II. Methodik

Für die repräsentative Beprobung der einzelnen Sandspielplätze wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation der MUG eine Vorgehensweise zur Probenentnahme erarbeitet. Dazu wurde, unabhängig von der Form des Spielplatzes, mit Hilfe eines Kunststoffnetzes mit einem Meter Maschenweite ein Meter-Raster über die zu beprobende Fläche aufgebracht. Für jeden Spielplatz wurden nach dieser Methodik Einzelproben an den Meter-Schnittstellen entnommen und zu einer Sammelprobe vereinigt. So konnte eine Vergleichbarkeit der entnommenen Proben gewährleistet werden. Um witterungsbedingte Unterschiede in den Ergebnissen auszuschließen, wurden alle Proben vormittags (verteilt auf zwei aufeinanderfolgende Tage) bei gleichbleibender Wetterlage genommen (sonnig, trocken, keine Niederschläge innerhalb der letzten 48h). Alle Proben wurden außerdem aus derselben Tiefe von 3cm entnommen.

E. coli und coliforme Bakterien sind Hygieneindikatororganismen für die mikrobiologische Beurteilung von Wasser und Lebensmitteln, sie werden stellvertretend für Krankheitserreger erfasst.³⁸ Die Gruppe der coliformen Keime umfasst neben fakultativ pathogenen Arten wie *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Escherichia* auch apathogene Arten, die als Umweltkeime einzuordnen sind (z.B. *Rahnella*, *Kluyvera*,...).

(38) Universität Wien 2013

Die Untersuchung von *E. coli* von Kindersandspielplätzen lässt die Beurteilung einer eventuellen fäkalen Verunreinigung menschlichen oder tierischen Ursprungs zu.

E. coli kann durch verschiedenste Mechanismen eine Resistenz gegen normalerweise wirksame Antibiotika und –klassen ausbilden, hierbei spielen besonders mobile genetische Elemente eine große Rolle.³⁹

Zur Bewertung von Umweltproben hinsichtlich ihres Potentials als Reservoir für Antibiotika-resistente Bakterien ist *E. coli* daher besonders gut geeignet.

III. Ergebnisse

a) Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien

Insgesamt konnten im Rahmen der vorliegenden Studie in 98% der Spielplätze coliforme Bakterien und in 49% der Spielplätze *E. coli* nachgewiesen werden. Da die Gruppe der coliformen Bakterien auch Umweltbakterien enthält, ist der Nachweis der coliformen Gruppe als Fäkalindikator nur bedingt zulässig. Innerhalb der Gruppe der coliformen Bakterien konnten jedoch auch fakultativ pathogene Erreger wie *Klebsiella pneumonia*, *K. oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter amnigenus*, *E. aerogenes*, und *Serratia marcescens* detektiert werden, die zu unterschiedlichsten Krankheiten wie unter anderem Sepsis, Harnwegsinfektionen, Atemwegsinfektionen und Wundinfektionen führen können.⁴⁰

Der Nachweis von *E. coli* aus Sandspielplatzproben bestätigt jedoch eine Kontamination fäkalen Ursprungs. Da *E. coli* typischerweise im Darm von Mensch und Tier vorkommt, kommen somit unterschiedliche Kontaminationsquellen in Frage. Aus den erhobenen Daten lässt sich schließen, dass Sandspielplätze ein potentiell Reservoir für Fäkalkeime darstellen. Spielende Kleinkinder können durch Kontakt mit dem Spielplatzsand diese Keime aufnehmen und möglicherweise kolonisiert werden.

(39) Jouini et.al. 2009

(40) Surbaum et al. 2012

b) Korrelationen mit abiotischen Parametern

Um mögliche Zusammenhänge zwischen mikrobiologischen Ergebnissen und abiotischen Faktoren bestimmen zu können, wurden unter anderem folgende Parameter für jeden Spielplatz zum Zeitpunkt der Beprobung protokolliert: Vorhandensein und Art einer Einzäunung, Vorhandensein eines Habitats für Wasservögel (See, Teich,...) und dessen Entfernung vom Spielplatz, Vorhandensein eines Wasserspielplatzes, Beschattung, Verunreinigung, allgemeiner Zustand. Diese Parameter wurden vom beprobenden Team in Kategorien bestimmt. Zusätzlich wurde jede Sammelprobe hinsichtlich ihres Wassergehaltes untersucht.

Mittels statistischen Methoden wurden die erhobenen Daten am Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation der MUG ausgewertet und Korrelationen errechnet (die Auswertung basiert auf SPSS Version 20.)

Die Ergebnisse zeigen einen statistisch signifikanten Zusammenhang für die Keimzahlen der coliformen Keime mit dem Wassergehalt der Probe. Der Nachweis verschiedener Bakterien aus nassen Sandproben von Badestränden am Meer konnte in Griechenland von Papadakis et al. 1997 gezeigt werden. Die Autoren folgern aus den erhobenen Daten, dass insbesondere der nasse Sand eine Infektionsquelle für Bakterien und Pilze für Badende und spielende Kinder darstellt.⁴¹

Für die im Rahmen der vorliegenden Studie erhobenen Keimzahlen von *E. coli* konnten statistisch keine signifikanten Korrelationen mit den erhobenen Feuchtwerten nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte die niedrige Anzahl der insgesamt für *E. coli* positiven Spielplätze (22) für die statistische Auswertung sein.

Die anderen abiotischen Parameter zeigten keine signifikante Korrelation mit den Keimzahlen für *E. coli* und coliforme Bakterien. Es konnte weder für den Parameter Beschattung noch für Witterung ein statistischer Zusammenhang ermittelt werden. Da die Probenentnahme einheitlich in einer definierten Tiefe

(41) Papadakis et al. 1997

erfolgte, wird der Temperaturunterschied auf der Oberfläche durch fehlende Beschattung nicht wirksam. Da nur für einen geringen Anteil der beprobten Spielplätze ein Habitat für Wassertiere sowie eine Wasserspielmöglichkeit direkt am Sandspielplatz erhoben wurde, ist die statistische Korrelationsberechnung nur bedingt aussagekräftig. Die Charakterisierung der Spielplätze hinsichtlich gewisser Parameter scheint für die Interpretation der Ergebnisse nur bedingt relevant. So wurde das Vorhandensein einer Einzäunung dokumentiert. Passiert die Kontamination mit *E. coli* Bakterien jedoch über Tiere wie Hunde, Katzen oder Vögel, so stellen diese Einzäunungen keine Barriere dar. Auch offensichtliche Kontaminationen mit Müll oder Tierkot sowie die Einordnung in die Kategorie „nicht gepflegt“ konnten statistisch nicht mit einer höheren Keimzahl korreliert werden. Ein möglicher Grund ist wahrscheinlich, dass der Eintrag mit Fäkalkeimen über einen längeren Zeitraum und durch unterschiedliche Quellen passiert.

IV. Antibiotikaresistenz von *E. coli*

Insgesamt konnten 96 *E. coli* Isolate aus den Spielplatzsandproben angezchtet werden. Diese wurden mittels automatisiertem Resistenztestungssystem Vitek 2 (bioMérieux) und mittels Agardiffusion hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber 23 Antibiotika getestet. Von allen Isolaten waren insgesamt 18 Stämme resistent oder intermediär empfindlich gegenüber zumindest einem getesteten Antibiotikum. Die nachgewiesenen Resistenzraten schwanken zwischen 0 und 12,5%, wobei der höchste Wert für Ampicillin detektiert wurde. Es konnten keine Resistenzen gegenüber Carbapenemen (Imipenem, Meropenem), Aminoglykosiden (Gentamicin, Amikacin) und gegenüber Cefepim und Ceftazidim aus der Gruppe der Cephalosporine nachgewiesen werden. Innerhalb der *E. coli* Stämme wurden keine ESBL-Bildner detektiert.

Weltweit kann eine zunehmende Antibiotikaresistenz für *E. coli* dokumentiert werden. Neben der Zunahme im klinischen Bereich gibt es auch immer häufiger Berichte über den Nachweis von resistenten und multiresistenten *E. coli* aus dem Lebensmittel-, Veterinär- und Umweltbereich.⁴²

(42) Martins da Costa et al. 2013

Folgende Tabelle zeigt einen Vergleich der erhobenen Antibiotikaresistenzraten der *E. coli* Isolate aus den Sandspielplatzproben (intermediär empfindlich und resistent) mit *E. coli* Isolaten von Gesunden⁴³ und *E. coli* Isolaten von chirurgischen Intensivstationen im Einsendebereiches des Instituts für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der MUG.⁴⁴

Resistenzraten <i>E. coli</i>			
Antibiotikum	Sandproben	Gesunde	ICU Raum Graz
AM-Ampicillin	12,5	27,0	40,0
AMC-Amoxicillin/Clavulansäure	9,4	8,0	15,9
AN-Amikacin	0,0	0,0	0,9
CAZ-Ceftazidim	0,0	0,0	8,2
CIP-Ciprofloxacin	1,0	3,0	13,0
CTX-Cefotaxim	0,0	0,0	10,0
CXMA-Cefuroxim-Axetil	3,1	0,0	14,5
FEP-Cefepim	0,0	0,0	7,1
GM-Gentamicin	0,0	0,0	4,1
MEM-Meropenem	0,0	0,0	0,0
MXF-Moxifloxacin	2,1	3,0	15,6
SXT-Trimethoprim/Sulfamethoxazol	6,3	12,0	18,8
TZP-Piperacillin/Tazobactam	5,2	1,0	8,9
TE-Tetrazyklin	6,3	21,0	-

Tabelle 20: Vergleich Resistenzraten *E. coli*

Der Vergleich zeigt, dass die höchsten Resistenzraten im klinischen Bereich zu finden sind. Auch bei gesunden Erwachsenen liegen die Resistenzraten etwas höher als bei den Isolaten aus den Sandspielplätzen. Während die Screeninguntersuchung bei Gesunden eine ESBL-Rate von insgesamt 3,6% für *E. coli* angibt, wurden in den Umweltproben keine multiresistenten ESBL – bildenden *E. coli* gefunden.⁴⁵

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit zeigen, dass öffentliche Sandspielplätze ein Reservoir für coliforme Bakterien und *E. coli* darstellen, diese Keime konnten in

(43) Breitler 2013

(44) Feierl et al. 2012

(45) Breitler 2013

unterschiedlichen Quantitäten nachgewiesen werden. Innerhalb der isolierten *E. coli* Bakterien wurden Resistenzen gegen 13 verschiedene Antibiotika detektiert. Sandspielplätze stellen somit auch eine Quelle für *E. coli* mit erworbener Antibiotikaresistenz dar. Diese Bakterien können möglicherweise durch spielende Kinder aufgenommen werden. Eine Aufnahme von antibiotikaresistenten Bakterien kann nicht nur zur Kolonisation führen, sondern auch zur Weitergabe genetischer Informationen, die für die Antibiotikaresistenz verantwortlich sind.⁴⁶

Weiterführende molekulargenetische Untersuchungen sind nötig, um die isolierten *E. coli* Stämme aus den Sandspielplätzen hinsichtlich ihrer Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren genauer zu charakterisieren und somit ihr Potential als Infektionserreger einzuordnen. Eine genetische Typisierung der Isolate kann möglicherweise auch Hinweise auf ihre Eintragsquelle liefern.

(46) Martins da Costa et al. 2013

5 Literaturverzeichnis

- (1) Centers for Disease Control and Prevention (2010): About antimicrobial resistance: A brief overview. URL: <http://www.cdc.gov/drugresistance/about.html> - Download vom 29.09.2013.
- (2) World Health Organization: Antimicrobial resistance. Letzte Aktualisierung: Mai 2013. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en> - Download vom 28.09.2013.
- (3) Martins da Costa, P; Loureiro, L. & Matos A.: Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria Between Intermingled Ecological Niches: The Interface Between Humans, Animals and the Environment. In: International Journal of Environmental Research and Public Health Jg. 10 / 2013, Heft 1, S. 278-294.
- (4) Feierl, G [u.a.] (Hrsg.): Resistenzbericht 2012. Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin, Medizinische Universität Graz, Labor für Medizinische Bakteriologie und Mykologie. Graz: 2013.
- (5) Suerbaum, S; Hahn, H; Burchard, G; Kaufmann S & Schulz, T: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. 2012.
- (6) Bundesministerium für Gesundheit (BMG). Resistenzbericht AURES 2011 – Resistenzbericht Österreich. 1.Auflage.: Bundesministerium für Gesundheit (BMG); 2012.
- (7) Kruse, E.-B. & Dettenkofer M.: Epidemiologie von und Präventionsmaßnahmen bei multiresistenten Erregern. In: Ophthalmologie Jg. 107 / 2010, Heft 4, S.313-317.
- (8) Diefenbeck, M; Mückley, T. & Hofmann, G.O.: Multiresistente Erreger im Krankenhaus. In: Trauma und Berufskrankheit, Supplement 1. 2008.
- (9) Bundesministerium für Gesundheit (BMG). AURES 2012. Resistenzbericht Österreich. Antibiotikaresistenz und Verbrauch antimikrobieller Substanzen in Österreich. 1. Auflage: November 2013.
- (10) Pitout, J. & Lauplan, K. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. In: Lancet Infect Dis 2008, Heft 8, S. 159-166.

- (11) Schröppel, K & Riessen R: Multiresistente gramnegative Bakterien. Problemkeime des 21. Jahrhunderts. In: Med Klein Intensivmed Notfmed. Jg. 108/2013, Heft 2, S.107-112.
- (12) Feuerpfeil, I; López-Pila, J; Schmidt, R; Schneider, E & Szewzyk, R: Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. In: Bundesgesundheitsbl- Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz. Jg. 42/1999, Heft 1, S.37-50.
- (13) Birgy, A; Cohen, R; Levy, C; Bidet, P; Courroux, C; Benani, M; Thollot, F & Bingen, E (2012): Community faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in french children: In: BMC Infect Dis. 2012, Heft 12, S. 315. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/12/315> - Download vom 08.10.2013.
- (14) Kaarme, J; Molin, Y; Olsen, B & Melhus, A: Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy Swedish preschool children. In: Acta Paediatrica 2013, Jg.102/2013, Heft 6, S.655-660.
- (15) Universität Wien: Enterobakterien, Coliforme und *Escherichia coli*. URL: <http://univie.ac.at/hygiene-aktuell/coliformenvortrag.pdf> - Download vom 24.10.2013.
- (16) bioMérieux Deutschland (2013): Traditionelle Kulturmedien – Blutagar. URL: http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_IGL_PRD_CLN_18&pubparams.sform=5&lang=de – Download vom 29.09.2013.
- (17) bioMérieux Deutschland (2013): Lebensmittel-Industrie. URL: http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?doc=GRM_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_46 – Download vom 30.09.2013.
- (18) bioMérieux Deutschland (2013): Chromogene Medien – chromID MRSA. URL: http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_77&pubparams.sform=8&lang=de – Downlad vom 11.09.2013.
- (19) bioMérieux Deutschland (2013): Chromogene Medien – chromID CARBA Agar, [online] http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_77&pubparams.sform=3&lang=de [11.09.2013]

- (20) bioMérieux Deutschland (2013): Chromogene Medien – chromID ESBL. URL:
http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_77&pubparams.sform=7&lang=de –
Download vom 11.09.2013.
- (21) bioMérieux Deutschland (2013): Chromogene Medien – chromID VRE. URL:
http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_77&pubparams.sform=15&lang=de –
Download vom 11.09.2013.
- (22) bioMérieux Deutschland (2013): Chromogene Medien – chromID *S. aureus*. URL:
http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_77&pubparams.sform=12&lang=de –
Download vom 13.09.2013.
- (23) bioMérieux Deutschland (2013): Vitek 2 – URL:
http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_11 – Download vom 23.10.2013.
- (24) Heipha Diagnostika (2011): Thioglycolat-Bouillon Clear. URL:
http://www.heipha.de/files/product/de/490100d-3-0111_Thioglycolat-Clear.pdf -
Download vom 30.09.2013.
- (25) BD (2006): BBL Enterococcosel Broth. URL:
http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007453%2808%29%280706%29_DE.pdf – Download vom 30.09.2013.
- (26) Springer Medizin (2010): Verkürzte Analysezeit bei höherer Genauigkeit. URL:
<http://www.springermedizin.at/artikel/20050-verkuerzte-analysezeit-bei-hoeherer-genauigkeit> - Download vom 12.09.2013.
- (27) EUCAST European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
(Dezember 2009): Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing –
Version 1.0. URL:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Germany/Disk_diffusion_v1.0_-_german_manual.pdf - Download vom 12.09.2013.
- (28) Jouini, A; Ben Slama, K; Sáenz, Y; Klibi, N; Costa, D; Vinué, L; Zarazaga, M; Boudabous, A & Torres C: Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin in Tunis. In: J. Food Prod. 2009, 72(5):1082-8.

- (29) Papadakis, J; Mavridou, A; Richardson, S; Lamprini, M & Marcelou, U: Bather-related microbial and yeast populations in sand and seawater. In: Water Research, Jg, 31/1997, Heft 4, S.799-804.
- (30) Breitler, V.: Resistenzverhalten von *E. coli* bei Gesunden. Fachhochschule Wiener Neustadt, Bachelorarbeit: 2013.