

Diplomarbeit

**NACHWEIS UND IDENTIFIKATION VON  
MULTIRESISTENTEN (MDR) BAKTERIEN IN  
TIERISCHEN LEBENSMITTELN  
mit spezieller Betrachtung von faschiertem Fleisch**

eingereicht von

**Christian Petternel**

Geb.Dat.: 20.09.1985

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin**

unter der Anleitung von

**Ass.-Prof. Dr. med. univ. Feierl Gebhard**

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

Ort, Datum .....

(Unterschrift)

## 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 .....*

*Unterschrift*



## Danksagungen

Im möchte mich an dieser Stelle bei meinen beiden Diplomarbeitbetreuern Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Reinthaler F. Franz und Herrn Ass.-Prof. Dr. med. univ. Feierl Gebhard bedanken, die mir die vorliegende Arbeit ermöglicht haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonderer Dank gilt auch den direkt am Hygienefondsprojekt beteiligten Personen für die enge Zusammenarbeit: Mag. Dr. rer. nat. Galler Herbert, Mag. Dr. rer. nat. Zarfel Gernot und Mag.<sup>ra</sup> rer. nat. Luxner Josefa. Mein Dank gilt auch Mag.<sup>ra</sup> Dr.<sup>in</sup> rer. nat. Haas Doris, Dr.<sup>in</sup> scient. med. Habib Juliana, den Mitarbeitern der medizinischen Parasitologie Mag.<sup>ra</sup> rer. nat. Klem Gabriele, Herrn Ruckenbauer Gerald und Heiling Bettina.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der Bakteriologie ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die stets für mich da war.

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Resistente Bakterien sind ein bekanntes Problem im Gesundheitswesen. Diese Studie wurde durchgeführt um die Prävalenz und genetischen Eigenschaften von resistenten Bakterien in gemischtem Faschiertem vom Schwein und Rind zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf ESBL-Produzenten (*Escherichia coli* und *Klebsiella* spp) und MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) gelegt.

**Methode:** Im Zeitraum von September 2011 bis September 2012 wurden 100 Proben gemischtes Faschiertes vom Rind und vom Schwein aus Supermärkten (n=70) und Fleischereien (n=30) gesammelt. Nach Anreicherung in einem Flüssigmedium (Peptonwasser) und Beimpfung auf feste Selektivmedien wurden Bakterien von chromeID™ ESBL (bioMérieux) und OXA Agar selektiert und nachfolgend mit MALDI-TOF MS Axima™ Assurance (Shimadzu, Japan) und VITEK®2 System (bioMérieux) identifiziert. Für alle isolierten Bakterien wurden Resistenztestungen mittels Agardiffusion durchgeführt. Die ESBL-Produktion wurde phänotypisch mit dem „double disk diffusion“-Test nach CLSI Richtlinien bestätigt. Die Resistenzgene von den ESBL-Produzenten und die *spa* Typisierung von MRSA wurden mit Hilfe von PCR und Sequenzierung bestimmt.

**Ergebnisse:** Insgesamt wurden 277 Stämme vom ESBL Agar isoliert und auf Antibiotikaresistenzen getestet. Dabei fand man in 20 von 100 Fleischproben ESBL-produzierende *Escherichia coli*. Der häufigste ESBL Typ bei *Escherichia coli* war CTX-M-1, es wurden aber auch CTX-M-14, CTX-M-32; SHV-12 und TEM-52 gefunden. Außerdem wurde in 10 Proben MRSA gefunden und mittels *spa* Typisierung bestätigt. Gefundene *spa* Typen waren LA (livestock-associated) t011, t034 und t2241, aber auch CA (community-acquired) t3928.

**Diskussion:** Eine Kontamination von Rinder- und Schweinefleisch mit multiresistenten Bakterien konnte in dieser Studie bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl ESBL-bildende Keime, welche u.a. für Harnwegs- und Wundinfektionen verantwortlich sind, aber auch MRSA, ein Auslöser von Septikämien, Pneumonien, sowie Haut- und Weichteilinfektionen, in den Fleischproben präsent war. Trotzdem muss noch untersucht werden wie weit diese bakterielle Belastung für Infektionen beim Menschen verantwortlich ist, und wenn dies der Fall wäre, für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen verantwortlich ist.

## Abstract

**Background:** Resistant bacteria are a well-known public health problem. This study was conducted to investigate the prevalence and genetics of resistant bacteria in mixed minced meat from pork and beef. Therefore special attention was paid to ESBL producers (*Escherichia coli* and *Klebsiella* spp) and MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

**Methods:** Between the month of September 2011 and the month of September 2012 100 samples of minced meat from pork and beef were collected from supermarkets (n=70) and local butcher shops (n=30) in the city of Graz (Styria/Austria). After enrichment in liquid culture medium (peptone broth) and inoculation on selective media, bacteria were selected from chromeID™ ESBL (bioMérieux) and OXA agar and subsequently identified with MALDI-TOF MS Axima™ Assurance (Shimadzu, Japan) and VITEK®2 system (bioMérieux). All isolated bacteria were tested for antibiotic resistance using disc diffusion test. The ESBL production was confirmed by double disc diffusion test according to current CLSI guidelines. Resistance genes of ESBL producers and *spa* types of MRSA were detected with PCR and sequencing.

**Results:** Overall 277 strains were isolated from the ESBL agar and tested for antibiotic resistance. ESBL producing *Escherichia coli* could be found in 20 of the 100 meat samples. The most common ESBL type among *Escherichia coli* was CTX-M-1, but also CTX-M-14, CTX-M-32, SHV-12 and TEM-52 were found. Moreover 10 samples were tested positive for MRSA and confirmed by *spa*-typing. Detected *spa*-types were LA (livestock-associated) t011, t034 and t2241, as well as CA (community-acquired) t3928.

**Conclusion:** A contamination of beef and pork with multiresistant bacteria was confirmed in this study. It could be shown that ESBL, cause of urinary tract infections (UTI) and wound infections, and MRSA, cause of septicaemia, pneumonia, as well as skin and soft tissue infections (SSTI), are present in meat samples. However it has to be investigated how much this bacterial pollution contributes to infections in humans and if so, being responsible for the spread of antibiotic resistance.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagungen .....	iv
Zusammenfassung .....	v
Abstract .....	vi
Inhaltsverzeichnis .....	vii
Glossar und Abkürzungen .....	ix
Abbildungsverzeichnis .....	x
Tabellenverzeichnis .....	xi
1 Einleitung .....	1
2 Antibiotikaresistenz .....	4
3 ESBL-bildende Bakterien .....	7
3.1 Gramnegative-ESBL Bildner .....	9
3.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	9
3.1.2 <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	10
3.1.3 Enterobacteriaceae .....	10
3.2 $\beta$ -Laktamasen .....	15
3.2.1 Extended-spectrum- $\beta$ -Laktamasen (ESBL) .....	15
3.2.2 Plasmidkodierte AmpC- $\beta$ -Laktamasen .....	17
3.2.3 Carbapenemasen .....	18
3.3 Epidemiologie .....	19
3.3.1 <i>E. coli</i> .....	19
3.3.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	20
3.4 Hygienerichtlinien bei ESBL-Bildnern .....	22
4 MRSA .....	23
4.1 Definition .....	23
4.2 Erkrankungen .....	23
4.3 Pathogenitätsfaktoren .....	24
4.4 Resistenzmechanismen .....	24

4.5	CA, LA, HA.....	25
4.6	Genetische Klassifikation .....	26
4.7	Therapie .....	26
4.8	Epidemiologie.....	27
4.9	Hygienerichtlinien bei MRSA.....	29
5	Material und Methoden.....	30
5.1	Arbeitsmaterialien und –geräte .....	30
5.1.1	Agarplatten .....	30
5.1.2	MALDI-TOF MS.....	33
5.1.3	VITEK <sup>®</sup> 2 (bioMérieux) .....	33
5.1.4	Resistenztestung .....	34
5.1.5	Molekulargenetische Methoden.....	36
5.2	Arbeitsprocedere.....	36
6	Ergebnisse .....	41
6.1	ESBL-produzierende gramnegative Bakterien .....	41
6.1.1	<i>Serratia</i> spp .....	42
6.1.2	<i>E. coli</i> .....	43
6.1.3	<i>Acinetobacter</i> spp .....	48
6.2	MRSA.....	49
6.3	Vergleich Supermärkte – Fleischer .....	50
7	Diskussion.....	51
7.1	Schlussfolgerung.....	57
8	Literaturverzeichnis .....	58

## Glossar und Abkürzungen

CMT	Complex mutant of TEM
ESBL	Extended-spectrum $\beta$ lactamase
Faschiertes (1) (österr.)	Hackfleisch
KESC	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter</i>
MALDI-TOF MS	„Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry“ (Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation Flugzeit Massenspektrometrie)
MDR	Multidrug resistant (multiresistent)
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
OMP	Outer membran proteins, Porine in gramnegativen Bakterien die von $\beta$ -Lactamantibiotika als Passage genutzt werden.
ORF	„Open Reading Frame“; Offener Leserahmen zwischen einem Start- und einem Stoppcodon, der ein Protein sequenziert.
PBP	Penicillinbindende Proteine, sind Transpeptidasen die an der Zytoplasmamembran lokalisiert sind und für den Aufbau der bakteriellen Zellwand zuständig sind (Murein-Synthetasen). Sind Angriffspunkte der Betalaktamantibiotika.
PVL	Panton-Valentine Leukocidin, ein Pathogenitätsfaktor von Staphylokokken.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vergleich der Resistenzraten von ESBL-bildendem <i>E. coli</i> mit nicht ESBL-bildendem <i>E. coli</i> im Jahr 2011 (1).....	2
Abbildung 2 Möglichkeiten der Übertragung von Resistenzgenen (11).....	5
Abbildung 3 Die vier wichtigsten Resistenzmechanismen (16) .....	6
Abbildung 4 Fluoreszierendes Pigment von <i>P. aeruginosa</i> .....	9
Abbildung 5 Resistenzraten für ESBL-positive <i>E. coli</i> von Humanproben aus dem klinischen und niedergelassenen Bereich im Jahresvergleich 2007/2011 (1) .....	12
Abbildung 6 Resistenzraten für <i>Klebsiella</i> spp von Humanproben aus dem klinischen und niedergelassenen Bereich aus dem Großraum Graz im Jahresvergleich 2007/2011 (1) .....	14
Abbildung 7 Europaweite Verteilung von 3. Generations Cephalosporin resistenten, invasiven <i>E. coli</i> -Isolaten (44) .....	20
Abbildung 8 Europaweite Verteilung von invasiven, 3. Generations Cephalosporin resistenten <i>E. coli</i> -Isolaten 2010 und 2011 ©ECDC (44) .....	20
Abbildung 9 Europaweite Verteilung von 3. Generations-Cephalosporin resistenten, invasiven <i>Klebsiella pneumoniae</i> -Isolaten 2010/2011 (44) .....	21
Abbildung 10 Grafische Darstellung der 3. Generations-Cephalosporin resistenten, invasiven <i>Klebsiella pneumoniae</i> -Isolate 2010 und 2011 © ECDC (44).....	21
Abbildung 11 MRSA Raten in Österreich von 2008 bis 2011 (43).....	27
Abbildung 12 Vergleich der Prävalenzen von invasiven MRSA in Europa zwischen 2010 und 2011 © ECDC (44) .....	28
Abbildung 13 Invasive MRSA Raten im Ländervergleich 2010 und 2011 (44) .....	28
Abbildung 14 Agardiffusionstest eines <i>E. coli</i> -Stammes .....	35
Abbildung 15 Verschiedene Etest®-Streifen .....	35
Abbildung 16 ESBL Screening Agar.....	38
Abbildung 17 Verteilung der isolierten Bakterien im faschierten Fleisch. ....	41
Abbildung 18 ESBL-Gene der 23 unterschiedlichen <i>E. coli</i> Stämme .....	46
Abbildung 19 Verteilung der ESBL-Gene von <i>E. coli</i> in den positiven Proben. ....	46
Abbildung 20 Detektierte <i>spa</i> -Typen von MRSA und deren Verteilung .....	49
Abbildung 21 Phylogenetischer Stammbaum von verschiedenen LA-MRSA mit dem <i>spa</i> -Typ t011 aus verschiedenen Ländern © <a href="http://saureus.mlst.net">http://saureus.mlst.net</a> .....	55

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Schema für Einteilung von Carbapenemasen .....	18
Tabelle 2 Agarplatten für quantitativen Keimnachweis.....	37
Tabelle 3 Agarplatten für qualitativen Nachweis multiresistenter Keime. ....	37
Tabelle 4 Getestete Antibiotika für <i>Enterobacteriaceae</i> .....	39
Tabelle 5 Resistenztestungen für <i>Staphylococcus</i> spp (68).....	40
Tabelle 6 Art und Anzahl ESBL-verdächtiger Isolate.....	42
Tabelle 7 Anzahl und Resistenzraten der <i>Serratia</i> spp .....	43
Tabelle 8 Anzahl und Resistenzraten der <i>E. coli</i> .....	44
Tabelle 9 Aufschlüsselung der Proben mit ESBL-positiven <i>E. coli</i> Stämmen und der detektierten $\beta$ -Laktamasen.....	45
Tabelle 10 Vergleich der Resistenzen von ESBL-postiven <i>E. coli</i> aus Faschiertem und von ESBL-bildenden <i>E. coli</i> aus dem Humanbereich (1).....	47
Tabelle 11 Anzahl und Resistenzraten der <i>Acinetobacter</i> spp .....	48
Tabelle 12 Aufschlüsselung der Proben mit MRSA.....	49
Tabelle 13 Resistenzmuster der detektierten MRSA inklusive <i>spa</i> -Typ .....	50
Tabelle 14 Vergleich von Supermärkten und Fleischereien in Bezug auf jene Proben, die mit ESBL-bildenden <i>E. coli</i> bzw. MRSA belastet waren.....	50

# 1 Einleitung

Multiresistente (MDR) Bakterien gewinnen wegen ihrer weltweit immer größeren Verbreitung im stationären und niedergelassenen Bereich zunehmend an Bedeutung. Dabei spielen v.a. Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-bildende *Enterobacteriaceae*, wie *E. coli* und *Klebsiella* spp eine entscheidende Rolle (3). Oft bleiben gängige Antibiotika wirkungslos und man muss auf eine beschränkte Anzahl an Reserveantibiotika zurückgreifen. Neben der großen Bedrohung für die Gesundheit von PatientInnen verursachen multiresistente Bakterien auch längere Krankenhausaufenthalte und höhere Krankenhauskosten (4). Resistenzen entstehen dabei nicht nur durch den Einsatz von Antibiotika im Humanbereich, sondern auch durch deren Verwendung im Veterinärbereich (5).

Es gab von öffentlichen Stellen und den Medien immer wieder Berichte, die auf eine bakterielle Kontamination von tierischen Lebensmitteln mit antibiotika-resistenten Erregern hinwiesen: Für Beunruhigung bei Konsumenten dürfte wohl ein Artikel über antibiotikaresistente Keime in Hühnerprodukten gesorgt haben, der im März 2012 von Global 2000, einer österreichischen Umweltschutzorganisation, herausgegeben wurde. Das Ergebnis: In drei von insgesamt sieben Proben aus Geflügelprodukten wurden ESBL-bildende *E. coli* nachgewiesen. Drei Proben enthielten Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stämme (6).

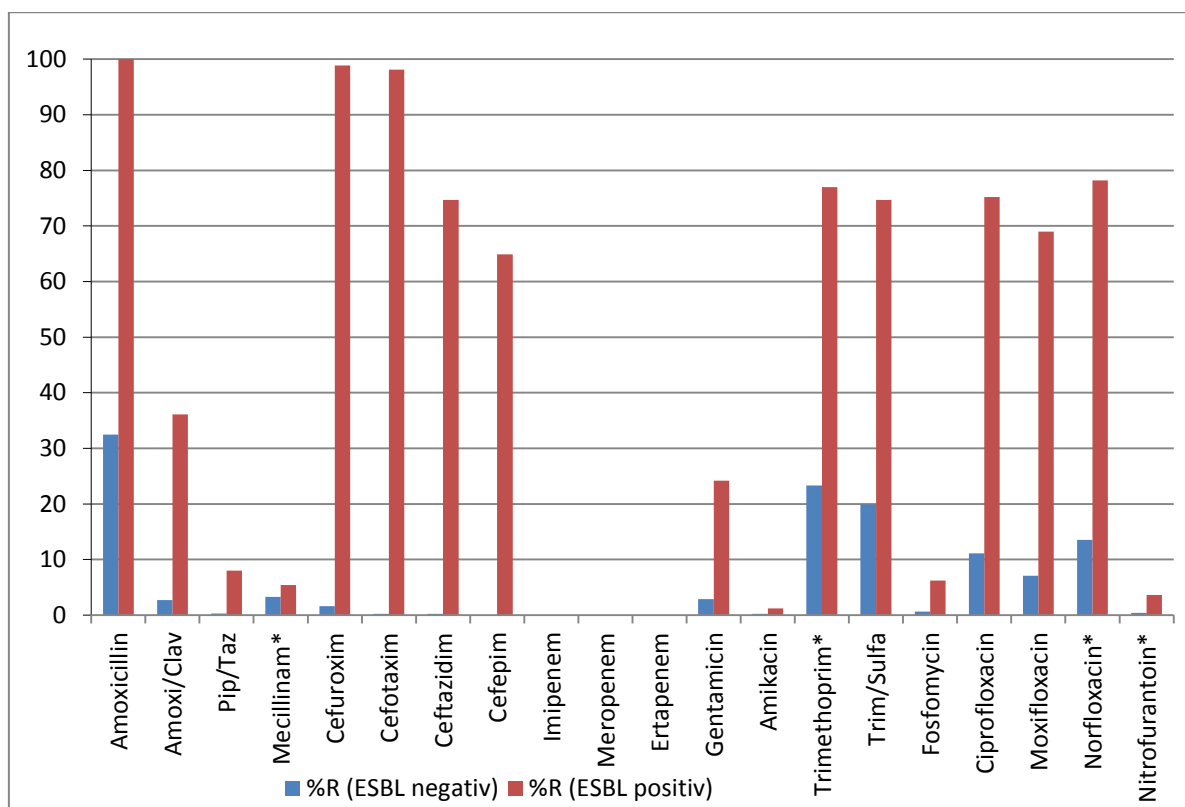
Das Vorkommen von antibiotikaresistenten Keimen beschränkt sich aber nicht nur auf Hühnerprodukte. Im Jahr 2011 untersuchte die Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) tierische Lebensmittel. Neben Hühnerprodukten wurden auch Proben aus faschiertem Rinder- bzw. Schweinefleisch untersucht. Obwohl in keiner von den 16 Proben aus gemischtem Faschiertem ESBL-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden konnten, wurde in einer von 28 Proben aus reinem Rinderfaschiertem und ebenfalls in einer von 27 Proben aus Schweinefaschiertem jeweils ein ESBL-produzierender *E. coli* nachgewiesen (7). Man kann vermuten, dass wegen der geringen Probenzahl aus gemischtem Faschiertem keine ESBL-produzierende *E. coli* in ebendiesem gefunden wurde.

Anfang Februar 2012 veröffentlichte das deutsche Magazin „Stern“ einen Artikel, der auf die Zunahme von antibiotikaresistenten Keimen in Schweinefleisch

aufmerksam machte. Dabei fand man in fünf von insgesamt 20 Proben aus abgepacktem Fleisch aus unterschiedlichen regionalen Supermärkten ESBL-produzierende *E. coli* (8). *E. coli* gilt als Auslöser von Lebensmittel-assoziierten Gastroenteritiden, Harnwegsinfektionen, Bakteriämien, Wundinfektionen und Bauchfellentzündungen (Peritonitis) (9). Bei Neugeborenen kann er eine Entzündung der Hirnhäute (Meningitis) auslösen. Produziert dieser Keim zusätzlich eine  $\beta$ -Laktamase kann dies die Therapieoptionen für den Patienten erheblich einschränken.

In der folgenden Abbildung (Abbildung 1) werden die Resistenzraten von ESBL-bildendem mit nicht ESBL-bildendem *E. coli* verglichen. Die Daten stammen aus dem Resistenzbericht 2011 des Instituts für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin (2).

**Abbildung 1 Vergleich der Resistenzraten von ESBL-bildendem *E. coli* mit nicht ESBL-bildendem *E. coli* im Jahr 2011 (1). Alle Isolate stammen von Humanproben aus dem klinischen oder niedergelassenen Bereich. \*) Antibiotika nur bei Harnisolaten getestet**



ESBL-bildende *E. coli* haben im Bereich der Aminopenicilline (Amoxicillin) Resistenzraten von bis zu 100%, 75% bei Fluorchinolonen (Ciprofloxacin) und Resistenzraten zwischen 65 und 98% bei Cephalosporinen der dritten und vierten Generation (Cefotaxim, Cefepim). Vereinzelt kam es sogar schon zu Resistenzen gegen die hochwirksamen Carbapeneme (Meropenem und Ertapenem). Die

Antibiotikaresistenzen von *E. coli* können den Behandlungserfolg von oben genannten Erkrankungen negativ beeinflussen und stellen somit ein gravierendes Problem im Gesundheitswesen dar.

Inwieweit die bakterielle Kontamination von tierischen Lebensmitteln mit diesen Keimen zur Kolonisation, Infektion und Verbreitung von Resistenzen im Gesundheitswesen beitragen, ist bisher nur wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, die Prävalenz von MRSA und ESBL-Bildnern in faschiertem Schweine- und Rindfleisch festzustellen und ob sich diese Bakterienarten genotypisch von jenen unterscheiden, die im humanmedizinischen Bereich vorkommen.

## 2 Antibiotikaresistenz

Multiresistente Bakterien stellen wegen der eingeschränkten therapeutischen Optionen, der hohen Krankenhauskosten und der Konsequenzen für die PatientInnen ein Problem im Gesundheitswesen dar. Oft anzutreffende ESBL-Produzenten sind vorwiegend Enterobakterien wie, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, aber auch *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii*. Andere multiresistente Keime sind der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) (10,11).

In antibiotikaunempfindlichen Bakterien findet man Resistenzmechanismen, die angeboren oder erworben sein können. Bei ersteren ist der Resistenzmechanismus im Genom codiert und folglich die gesamte Bakterienart gegen das Antibiotikum unempfindlich. Als Beispiel wäre die Resistenz von *E. coli* gegenüber Vancomycin zu nennen. Erworbene Resistenzen gehen meist von einem mutierten Bakterienklon aus und sind dann nur bei einem Stamm der primär sensiblen Bakterienart, zu finden. Auslöser für erworbene Resistenzen sind:

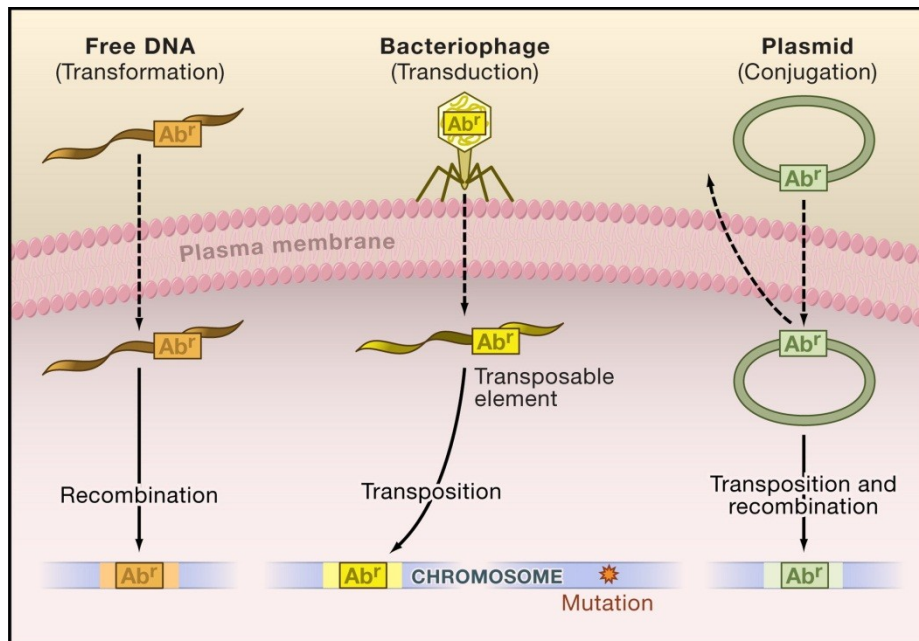
- I. Veränderungen des Genoms
- II. Gentransfer zwischen zwei Bakterien
- III. Kombination der vorher genannten Mechanismen.

Mutationen können das chromosomale Genom eines Bakteriums verändern. Spontan treten sie äußerst selten auf und sind dann meist Folge von Lese- bzw. Schreibfehlern oder von mangelhaften Korrekturen geschädigter DNA. Bei spontanen Mutationen kommt es eher zu Strukturveränderungen des betroffenen Bakteriums als zu Veränderungen im Zellstoffwechsel. Erworbene Resistenzen entstehen häufiger durch den horizontalen Austausch mobiler genetischer Elemente, wie Plasmide, Transposons, Integrons oder Bakteriophagen (12).

Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle die extrachromosomal lokalisiert sind und sich unabhängig vom chromosomalen Genom replizieren können. Transposons, auch als „springende Gene“ bezeichnet, sind von sich wiederholenden Sequenzen (repeats oder inverted repeats) umgeben und bei der Übertragung von Resistenzgenen in das Genom der Empfängerzelle zuständig (13). Integrons sind in der Lage Genabschnitte, auch als Genkassetten bezeichnet, aus dem Chromosom oder von Plasmiden anderer Bakterien einzufangen und mit Hilfe der Integrase in das Wirtsgenom einzubauen (14).

Plasmide werden dabei durch Konjugation und Transformation, Transposons durch Konjugation und Integrons, aber auch Bakteriophagen, durch Transduktion übertragen (15). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass sich Resistenzgene auf Plasmiden schneller verbreiten als jene, die auf Chromosomen lokalisiert sind.

Abbildung 2 Möglichkeiten der Übertragung von Resistenzgenen (11)

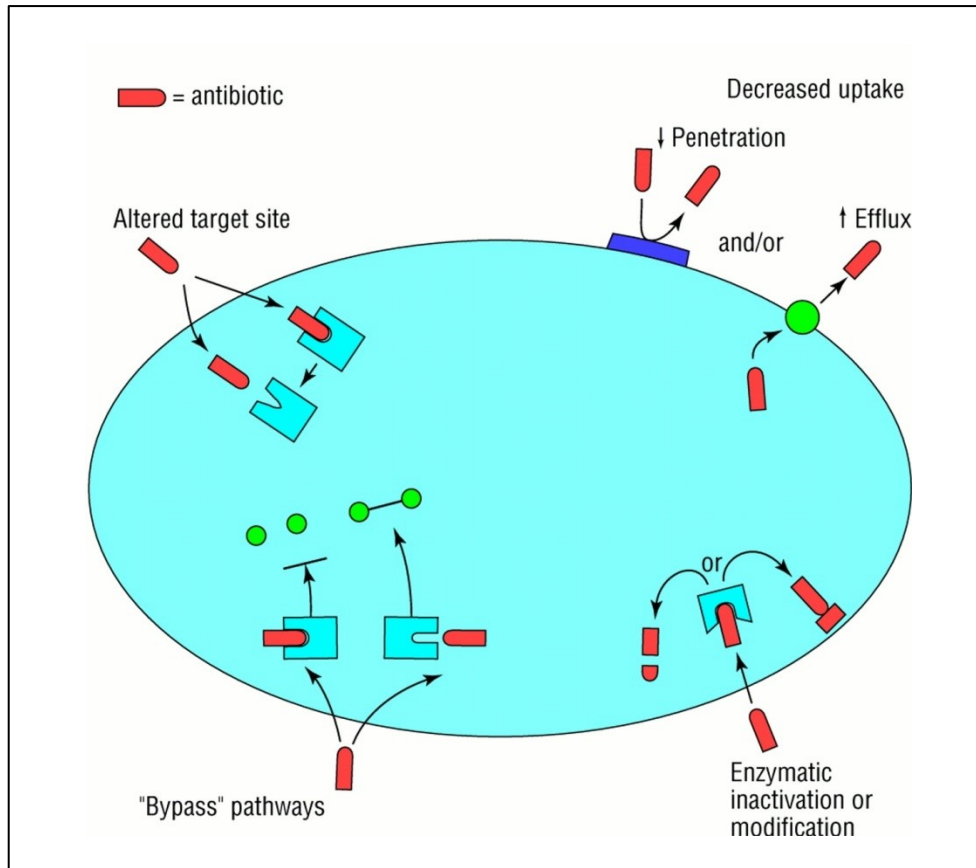


Die Konsequenz aus diesen Veränderungen der Erbinformation ist die Entstehung von neuen Resistenzmechanismen, wie z.B. der Bildung antibiotikainaktivierender Enzyme (z.B. ESBL). Es können aber auch die Angriffspunkte oder die Durchlässigkeit der Zellwand für Antibiotika verändert werden. Chemotherapeutika können bei Vorhandensein entsprechender Resistenzgene auch aktiv durch Effluxmechanismen aus der bakteriellen Zelle transportiert werden. Das Bakterium kann sich ebenso durch Ausbildung alternativer Stoffwechselschritte, die von der Antibiotikawirkung unbeeinflusst bleiben, schützen (12).

Die Permeabilität der Bakterienmembran für Antibiotika bei gramnegativen Bakterien kann durch Veränderung der Schrankenproteine, auch als Porine bezeichnet, verändert werden. Als Beispiel wäre die Imipenemresistenz von *Pseudomonas aeruginosa*, auf Grund des Fehlens des D2 Porins, zu nennen. Auch wenn das Antibiotikum die Zellmembran erfolgreich überwinden kann, können veränderte Zielmoleküle dessen Wirkung unterbinden, wie z.B. bei der primären Resistenz von Enterokokken gegenüber Cephalosporinen aufgrund der niedrigen Affinität der Penicillinbindenden Proteine (PBP) zu ebendiesen Wirkstoffen. Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* umgeht die Blockierung

von PBP durch die zusätzliche Produktion von PBP2a, welches die gleiche Funktion hat, aber im Gegensatz zu ersteren nicht von Flucloxacillin inaktiviert wird (16).

Abbildung 3 Die vier wichtigsten Resistenzmechanismen (16)



Eine häufige Ursache für die Verbreitung von resistenten Keimen im Gesundheitswesen ist mangelnde Krankenhaushygiene. Ein wichtiger Grund für die Ausbildung von Resistenzmechanismen in Bakterien ist der übermäßige Einsatz von Antibiotika in der Nutztierhaltung (12), aber auch in der Humanmedizin.

### 3 ESBL-bildende Bakterien

Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika können durch folgende Mechanismen entstehen: Es kann durch Produktion von  $\beta$ -Laktamasen zur Inaktivierung des Antibiotikums über Spaltung des  $\beta$ -Lactamringes oder durch Veränderungen in der Struktur von Penicillin-bindenden Proteinen (PBP) zur Antibiotikaresistenz kommen. PBPs sind für den Aufbau der bakteriellen Zellwand zuständig und Angriffspunkt der  $\beta$ -Lactamantibiotika. Bei Strukturveränderungen können die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika die PBPs nicht mehr inaktivieren und bleiben somit wirkungslos. Bei fehlender Ausbildung von Außenmembranproteinen (OMP) kann sich ebenfalls eine Antibiotikaresistenz bilden. OMPs stellen in gramnegativen Bakterien die Verbindung zwischen äußerer Zellmembran und Zellwand dar, die geöffnet oder geschlossen den Stoffaustausch des Bakteriums regeln. Sie werden aber auch von  $\beta$ -Lactamantibiotika genutzt um in das Bakterium zu gelangen (17). Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika entstehen am häufigsten durch Bildung von  $\beta$ -Lactamasen. Cephalosporine der 3. Generation, wie Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftazidim und der 4. Generation, wie Cefepim, sind grundsätzlich gegenüber  $\beta$ -Lactamasen stabil, können aber Ziele von mutierten, strukturveränderten  $\beta$ -Lactamasen werden (18). In Kombination mit  $\beta$ -Lactamaseinhibitoren, wie z.B. Clavulansäure oder Tazobactam, können ESBL erfolgreich gehemmt und  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wieder wirksam werden (17).

Eine der ersten Klassifikationen von  $\beta$ -Laktamasen wurde von Ambler im Jahre 1980 unternommen. Er ging davon aus, dass  $\beta$ -Laktamasen einen polyphyletischen, d.h. mehrstämmigen Ursprung haben und er unterteilte die  $\beta$ -Laktamasen aufgrund von molekularen und mechanistischen Eigenschaften in zwei Klassen (A und B). Klasse A waren Enzyme mit Serin im aktiven Zentrum, wie die Penicillinase von *Staphylococcus aureus*, Klasse B waren Metallo- $\beta$ -Lactamasen von *Bacillus cereus*. Ambler war damals schon überzeugt, dass in Zukunft weitere Klassen nötig sein werden, um die Vielfalt an  $\beta$ -Lactamasen zu erfassen (19).

So dauerte es nicht lange als 1981 eine ampC-Cephalosporinase eines *E. coli*, mit Verwandtschaft zu Cephalosporinasen von *Pseudomonas aeruginosa*, von Jaurin und Grundström gefunden und der neuen Klasse C zugeteilt wurde (20).

1987 wurde in der Arbeit von Ouellette, Bissonnette und Roy eine Plasmid-codierte Oxacillinase beschrieben, die keine Ähnlichkeiten zu bisher beschriebenen  $\beta$ -Lactamasen hatte, Resistenzen gegen Streptomycin und Sulfonamid verursachte, und deshalb einer eigenen Klasse D zugeordnet wurde (21).

1995 postulierten Bush, Jacoby und Medeiros eine andere Klassifikation, die funktionelle Eigenschaften der  $\beta$ -Lactamasen berücksichtigte. Sie ist eine Erweiterung der Bush-Einteilung aus dem Jahre 1989 (22).

Gruppe 1: Cephalosporinasen, die nicht ausreichend durch Clavulansäure gehemmt werden.

Gruppe 2:  $\beta$ -Lactamasen die von  $\beta$ -Lactamase Inhibitoren gehemmt werden (entspricht Ambler A und D). Durch den großen Zuwachs an  $\beta$ -Lactamasen in der Untergruppe 2b, wurde durch Hinzufügen von Kleinbuchstaben an 2b versucht eine bessere funktionelle Unterteilung zu erzielen. So sind die Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamasen in der Untergruppe 2be zu finden, um ihre Abstammung von der Gruppe 2b und ihr erweitertes Wirkspektrum gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit dem nachgestelltem „e“ deutlich zu machen. 2br sind eine Untergruppe von  $\beta$ -Lactamasen mit reduzierter („r“ für „reduced“) Affinität zu  $\beta$ -Lactamase Inhibitoren.

Gruppe 3: Metallo- $\beta$ -Lactamasen, welche zwar durch EDTA, kaum aber von  $\beta$ -Lactamase Inhibitoren gehemmt werden.

Gruppe 4: Penicillinasen, die nicht durch Clavulansäure gehemmt werden.

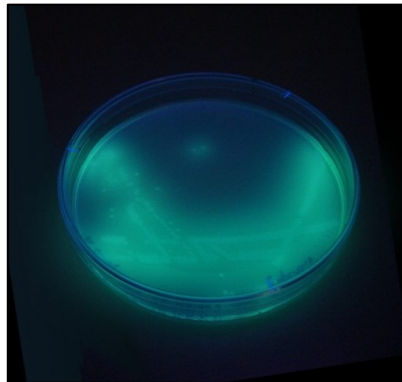
Zu den humanpathogen-relevanten ESBL-produzierenden Bakterien zählen *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*.

### 3.1 Gramnegative-ESBL Bildner

#### 3.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Dieser Keim ist für die kupfergrüne Verfärbung bei Wundinfektionen verantwortlich (aeruginous = engl. für grünspanartig). Er wächst in Flüssigkulturen als strikter Aerobier an der Flüssigkeit-Luft-Grenze und bildet dort bei entsprechender Bakterienzahl einen feinen Biofilm (Kahmhautbildung). Der süßliche Geruch und die blaugrüne Färbung in Flüssigkulturen sind charakteristische Eigenschaften von *Pseudomonas aeruginosa*. Er kann neben fluoreszierenden gelbgrünen, auch noch rote und braune Pigmente bilden. Auf Blutagar bilden Kolonien eine  $\beta$ -Hämolyse-Zone aus (13).

Abbildung 4 Fluoreszierendes Pigment von *P. aeruginosa*.



*Pseudomonas aeruginosa* ist ein Nass- und Pfützenkeim, der im Gesundheitswesen als nosokomialer Erreger in verunreinigten Augentropfen, Flüssigseifen, Desinfektionsmitteln, Beatmungs-, Inhalations- und Dialysegeräten vorkommen kann. In der Klinik präsentiert sich der Keim durch Entzündungen an unterschiedlichsten Lokalisationen: Otitis externa („swimmers ear“), Infektionen des Respirationstraktes (v.a. bei PatientInnen mit Zystischer Fibrose), Wundinfektionen, Harnwegsinfektionen und Endokarditiden. Systemisch kann er im schlimmsten Fall zu einem septischen Schock führen.

Die Therapie ist wegen der Effluxpumpen bzw geringen Porinzahl der Zellmembran auf wenige Antibiotika beschränkt und kann bei zusätzlicher Produktion von Metallo- $\beta$ -Laktamasen oder Extended-Spectrum  $\beta$ -Laktamasen zur Herausforderung werden. Sogar höher wirksame Carbapeneme, wie Imipenem und Meropenem, bleiben in manchen Fällen wirkungslos (23). Außerdem hat *Pseudomonas aeruginosa* die Fähigkeit sich zusätzliche Resistenzmechanismen

sogar während der Antibiotikatherapie anzueignen (24). Die Antibiotikawahl kann dann nur nach dem Antibiogramm des isolierten Stammes erfolgen.

### **3.1.2 *Acinetobacter baumannii***

*Acinetobacter baumannii* ist ein gramnegatives, unbewegliches (griech. akinētos = unbeweglich) Stäbchenbakterium. Er stellt niedrige Ansprüche an Nährböden, wächst in aerobem Milieu und ist Oxidase-negativ, aber Katalase-positiv. Im Gesundheitswesen sind multiresistente *Acinetobacter* spp problematisch, weil sie neben Infektionserreger bei PatientInnen auch als natürliche Besiedler im menschlichen Körper vorkommen. Risikofaktoren für eine Infektion mit multiresistenten *Acinetobacter baumannii* Stämmen sind (25):

- Eine frühere *Acinetobacter baumannii* Infektion
- Mechanische Beatmung
- Antibiotikaverordnung in der Anamnese
- Neurologische Krankheiten (zerebrovaskuläre Läsionen, traumatische Hirnschäden, Mb. Alzheimer, Rückenmarkserkrankungen)

Wirksame Antibiotika gegen nicht resistente *Acinetobacter baumannii* Stämme sind Carbapeneme, Aminoglykoside, Polymyxine, Tetracycline und Tigecyclin (26). Die Anzahl der angeborenen Resistenzen von *Acinetobacter* spp ist schon wegen der geringen Poringröße- und -zahl, der Effluxpumpen und der Cephalosporinasen-exprimierenden Gene sehr hoch. Diese wird bei multiresistenten Stämmen durch Produktion von ESBL, MBL und OXA-Carbapenemasen noch weiter gesteigert (27).

### **3.1.3 Enterobacteriaceae**

Zahlreiche ESBL-Bildner finden sich in der Familie der *Enterobacteriaceae*, zu der u.a. die Arten *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter* und *Proteus* zählen. Diese sind gramnegative, meist fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Sie sind im Oxidase-Test negativ und können Glucose abbauen. Ihr natürliches Reservoir ist der Darm von Mensch und Tier. Man findet sie aber auch in der Umwelt (Wasser, Boden). Enterobacteriaceae können Infektionen des Gastrointestinal-, Urogenital- und Respirationstraktes verursachen, aber auch im Blut von SepsispatientInnen und in Abszessen nachgewiesen werden (28). Wegen dem häufigen Vorkommen und der klinischen Relevanz werden nachfolgend

*Escherichia coli* und *Klebsiella* spp beschrieben. Andere weniger häufig isolierte ESBL-bildende Enterobakterien sind *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp und *Morganella morganii*.

### **3.1.3.1 *Escherichia coli***

Wie die Namensgebung vermuten lässt (*coli* – Genitiv von *colon*), kommt *E. coli* im tierischen und menschlichen Dickdarm vor. Sein Auftreten in Trinkwasser oder Lebensmitteln ist deshalb ein wichtiger Hinweis auf fäkale Verunreinigung und kann auf das Vorhandensein anderer Krankheitserreger (Würmer, Viren, Protozoen) hindeuten. Bei der serologischen Typisierung von *E. coli* sind v.a. die sogenannten O-Antigene bedeutsam. Dabei handelt es sich um Lipopolysaccharide in der äußeren Zellmembran des Bakteriums, die eine Antikörperreaktion verursachen und als solche im Serum nachgewiesen werden können (28).

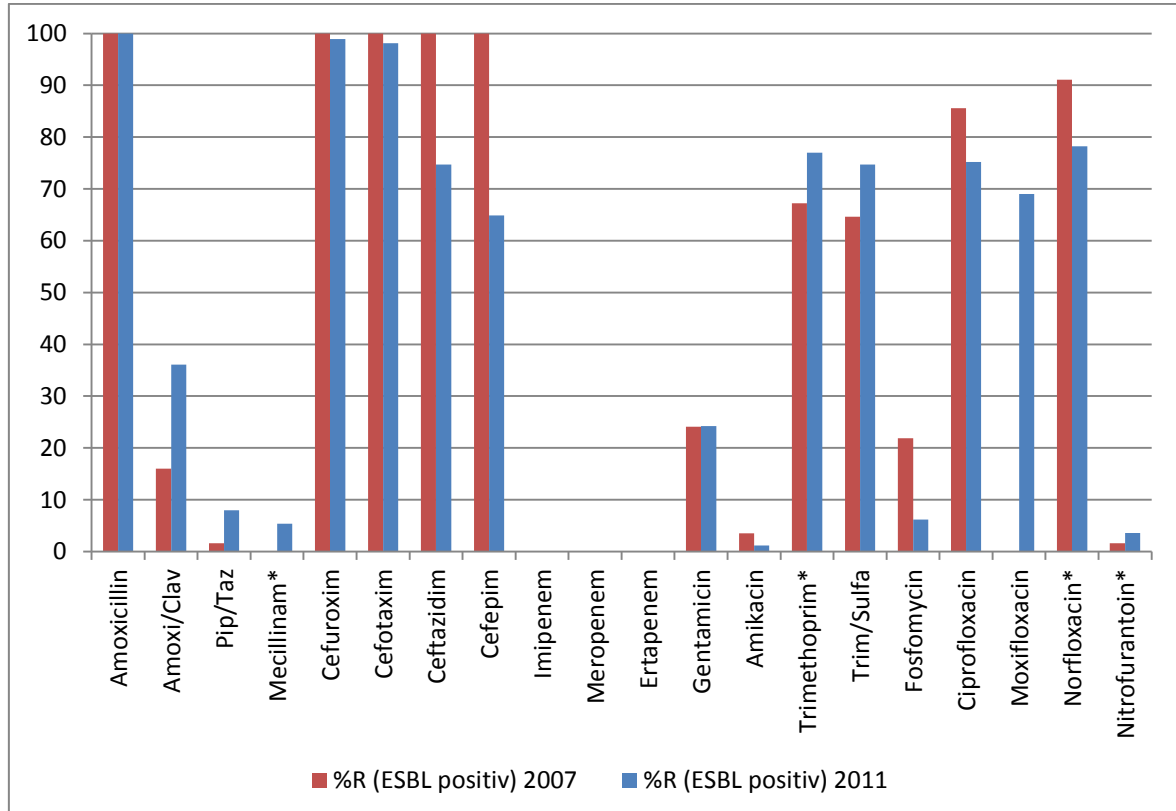
Eine Infektion mit *E. coli* kann sich klinisch extraintestinal als Meningitis bei Neugeborenen, häufiger jedoch als Infektion der ableitenden Harnwege manifestieren. Je nach betroffenem Abschnitt kann es zu einer Urethritis, Zystitis oder Pyelonephritis kommen. Im schlimmsten Fall kommt es bei systemischer Invasion zu einer Urosepsis, die tödlich enden kann.

Vier *E. coli* Subtypen sind für intestinale Infektionen verantwortlich: Enteropathogene *E. coli* (EPEC) führen zu Diarrhöen bei Säuglingen häufig in Entwicklungsländern. Enterotoxinbildende *E. coli* (ETEC) sind Verursacher der klassischen Reisediarrhöe („Montezumas Rache“) in Ländern mit tropischem Klima. Dafür ist ein, dem Cholera toxin ähnliches, hitzelabiles Entertoxin (LT I) verantwortlich. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) dringen in die Darmschleimhaut ein und zerstören diese. Das klinische Erscheinungsbild ähnelt dem der Ruhr (Shigellose) (13). Als letztes sind die Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) zu nennen, an welchen zu Beginn des Sommers 2011 fast 4000 Menschen in Deutschland erkrankten (29). Nach anfänglich falscher Beschuldigung von spanischen Gurkenproduzenten, bestätigte sich bei späteren Untersuchungen, dass ägyptische Bockshornklee-Samen, welche zur Sprossenproduktion verwendet wurden, Verbreiter der Epidemie waren (30). EHEC verursacht eine hämorrhagische Kolitis und das gefürchtete hämolytisch-urämisches Syndrom, mit

der typischen Trias aus akutem Nierenversagen, Anämie und Thrombozytopenie. (13,29)

Die Risikofaktoren für eine Infektion mit resistenten *E. coli* wurde bei einer Vergleichsstudie, die Träger von ESBL-bildenden *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* mit einer Kontrollgruppe, die mit nicht resistenten *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* infiziert waren, untersucht. Man kam zu dem Schluss, dass der totale Antibiotikakonsum eines Patienten bzw. einer Patientin der einzige unabhängige Risikofaktor für eine Besiedlung mit ESBL-bildenden Bakterien war. Der Gebrauch bestimmter Antibiotika, wie Cotrimoxazol und Aminoglykosiden, triggerte ebenfalls die Bildung von ESBL. Das einzig wirksame  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum gegen ESBL-produzierenden-*E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* war Imipenem. Als Alternativen kamen Fluorchinolone, wie Levofloxacin und Ofloxacin, in Frage. Aminoglykoside und Cotrimoxazol sollten wegen der hohen Resistenzraten und der oben genannten Gründe zurückhaltend verordnet werden (4).

Abbildung 5 Resistenzraten für ESBL-positive *E. coli* von Humanproben aus dem klinischen und niedergelassenen Bereich im Jahresvergleich 2007/2011 (1) Vor der Einführung von EUCAST im Juni 2011 wurden noch alle Cephalosporine als resistent interpretiert. \*) Nur bei Harnisolaten getestet



In Abbildung 5 sind die Daten aus dem Resistenzbericht 2011 dargestellt, welcher in regelmäßigen Abständen vom Labor für Bakteriologie und Mykologie der

Medizinischen Universität Graz veröffentlicht wird (1). Erfreulich, aber z.T. auch durch die Umstellung der Interpretation von Hemmhofdurchmessern (von CLSI auf EUCAST-Richtlinien) bedingt, ist dabei der Rückgang der Resistenzraten bei den 3. Generations-Cephalosporinen Ceftazidim und Cefepim. Bei dem häufig verordneten Medikament Augmentin® (Amoxicillin und Clavulansäure) war die Zunahme an Resistenzen bei ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten 2011 mehr als das doppelte (36,1%) so hoch wie noch 2007 (16,0%) (1,1). ESBL-bildender *E. coli* ist epidemiologisch im Raum Graz ein häufiger Problemkeim, insbesondere bei Harnwegsinfektionen im niedergelassenen und bei Wundinfektionen im klinischen Bereich (1).

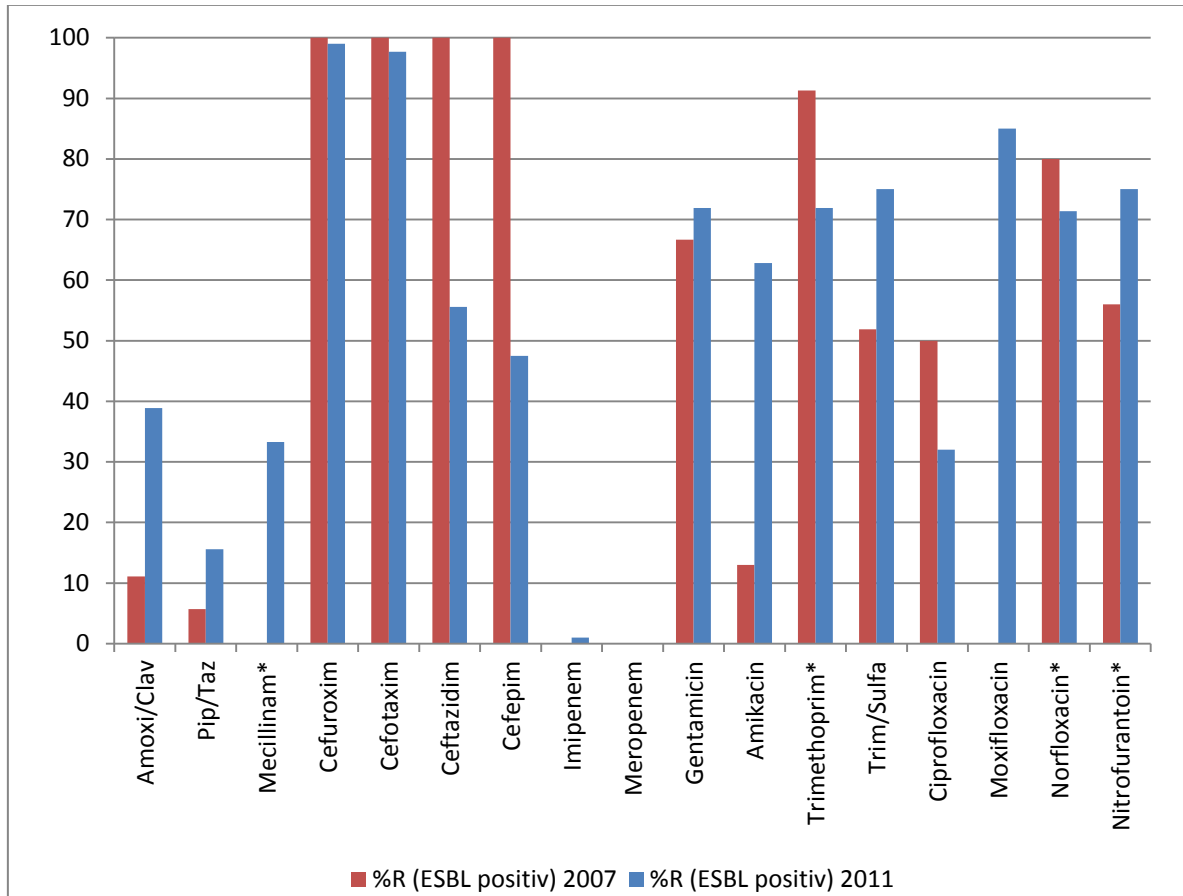
### 3.1.3.2 *Klebsiella* spp

Sind gramnegative, unbewegliche, bekapselte Stäbchenbakterien. Die Polysaccharid-Kapsel ist für das schleimig-glatte Wachstum der Kolonien auf Agarplatten verantwortlich. Aus klinischer Sicht sind die zwei wichtigsten Vertreter *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca* (13). *Klebsiella* spp verursachen neben Harnwegsinfektionen auch Pneumonien, Wundinfektionen und Septikämien. Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von *Klebsiella* spp ist die aus Polysacchariden bestehende Kapsel, welche das Bakterium in vielen Schichten umgibt und so von immunologischen Abwehrmechanismen (Phagozytose, Hemmung der Differenzierung von Makrophagen) abschottet. Die Fimbrien, auch als Pili bezeichnet, sind für die Anheftung des Bakteriums an den Zielorganen, wie Lunge und Niere zuständig. Eine weitere wichtige pathogenetische Eigenschaft von *Klebsiella* spp ist es, sich dem Komplementsystem im Serum zu entziehen. Das Bakterium besitzt darüber hinaus die Fähigkeit Siderophore zu bilden, die Eisenionen aus der Umgebung in die Zelle transportieren können. Die zwei bedeutsamsten Siderophore in *Klebsiella* spp sind Enterobactin und Aerobactin (31).

Im Krankenhaus sind *Klebsiella pneumoniae* Stämme mit Bildung von Carbapenemasen (KPC) oft schwer zu therapieren. Die meisten Antibiotika, wie z.B. Fluorchinolone und Aminoglykoside sind unwirksam, sodass oft auf das Polymyxin Colistin und das Tetracyclin-Derivat Tigecyclin zurückgegriffen werden muss (32). Letzteres sollte nur mit Vorsicht angewandt werden: 2011 wurde von Pfizer® auf die erhöhte Mortalität, die bei Tigecyclin-Einnahme in einer klinischen

Vergleichsstudie festgestellt wurde, hingewiesen. Das Antibiotikum soll laut Hersteller deswegen nur bei „komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen und komplizierten intraabdominellen Infektionen“ verwendet werden (33).

Abbildung 6 Resistenzraten für *Klebsiella* spp von Humanproben aus dem klinischen und niedergelassenen Bereich aus dem Großraum Graz im Jahresvergleich 2007/2011 (1) Vor der Einführung von EUCAST im Juni 2011 wurden noch alle Cephalosporine als resistent interpretiert.\*) Nur bei Harnisolaten getestet



Genau wie bei *E. coli* ist auch bei den *Klebsiella* spp eine Abnahme der Resistenzen gegen Ceftazidim und Cefepim und eine Zunahme bei Amoxicillin/Clavulansäure im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Auffallend ist die starke Zunahme an Resistenzen gegen Amikacin von 13,0% 2007 auf 62,8% 2011. Dieser Anstieg steht in Zusammenhang mit einem Ausbruch eines Amikacin-resistenten *Klebsiella oxytoca*-Stammes an einer Neonatologie. Am häufigsten wurden am Landeskrankenhaus *Klebsiella oxytoca* Stämme aus Screening-Stuhlproben isoliert. Im ambulanten Bereich überwiegen *Klebsiella pneumoniae*-Stämme aus Harnproben (1).

## 3.2 $\beta$ -Laktamasen

### 3.2.1 Extended-spectrum- $\beta$ -Laktamasen (ESBL)

Der Großteil der ESBL gehören molekulargenetisch der Ambler Gruppe A an und sind in der Bush-Jacoby-Medeiros Klassifikation in der eigenständigen Gruppe 2be zu finden (22).

ESBL hydrolysieren Amino- (Ampicillin, Amoxicillin und Bacampicillin) bzw. Acylureidopenicilline (Mezlocillin und Piperacillin), Cephalosporine aber nicht Cephamyne (Cefoxitin), und können erfolgreich durch  $\beta$ -Lactamase Inhibitoren, wie Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam, gehemmt werden. Die derzeit bekanntesten ESBL Familien sind CTX-M, SHV, TEM und PER. Es gibt aber auch noch VEB, GES, TLA, BES und OXA (17). Die Benennung der Familien erfolgte nach keinem einheitlichen Schema. So steht das CTX bei CTX-M für Cefotaxime und das „M“ für München, dem Ort der Erstbeschreibung. TEM beinhaltet die ersten drei Buchstaben des Familiennamens Temoneira, einer griechischen Patientin bei der die Erstisolierung erfolgte (19). Die ESBL in der Gruppe 2be unterscheiden sich von den  $\beta$ -Lactamasen der Gruppe 2b, von welcher sie sich abspalteten, meist nur in einer Aminosäure. Trotzdem reicht dieser geringe Unterschied aus, um das Substratspektrum der ESBL gegen Cephalosporine und das Monobactam Aztreonam zu erweitern. Deshalb auch die Namensgebung „extended spectrum  $\beta$ -Lactamase“ (34). Die Lahey-Klinik aus Merrimac, Massachusetts, hat es sich zum Ziel gemacht, die verschiedenen ESBL zu ordnen und Unterschiede zwischen den Enzymen aufzulisten. Zum Zeitpunkt, als diese Arbeit erstellt wurde, waren 202 TEM-, 167 SHV-, 18 OXA- $\beta$ -Lactamasen gelistet (<http://www.lahey.org/studies/> last accession July 2012). Dies sind insgesamt 387 verschiedene ESBL-Typen in nur diesen drei Gruppen.

#### 3.2.1.1 TEM

TEM-3 bis TEM-26, mit Ausnahme von TEM-13, sind ESBL. TEM-1 und 2 zählen zur Gruppe 2b. Der erste Fall einer Ceftazidim-resistenten *Klebsiella oxytoca* wurde erstmals 1982 an einer Neugeborenen-Station in Liverpool, England, beschrieben. Dort kam es zu einem Ausbruch von TEM-1 tragenden *Klebsiella oxytoca*, den man mit Ceftazidim zu behandeln versuchte. Unter dem Antibiotikadruck kam es aber zu einer Selektion von Ceftazidim-resistenten TEM-

12-Stämmen, damals als TEM-E2 bezeichnet. TEM-12 wies so große Ähnlichkeiten mit der TEM-1  $\beta$  Lactamase auf, dass die Verwandtschaft zwischen beiden Enzymen als gesichert anzusehen ist (35).

Obwohl der überwiegende Anteil an TEM- $\beta$ -Lactamasen zu den ESBL zählt, gibt es einige wenige TEM-Abkömmlinge, wie z.B. TEM-30, die von  $\beta$ -Lactamase Inhibitoren nicht gehemmt werden und auch keine Breitspektrum-Cephalosporine spalten können. Diese zählen konsequenterweise nicht zu den ESBL. Andererseits gibt es komplexe Mutanten von TEM- $\beta$ -Lactamasen (CMT), die nicht von  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren gehemmt werden und trotzdem Breitspektrum-Cephalosporine, wie Ceftazidim, spalten können (34).

### **3.2.1.2 SHV**

Die Abkürzung SHV steht für „sulfhydryl“-Variable und hat SHV-2 bis SHV-6 als wichtigste ESBL-Vertreter, welche erstmals 1983 in einer *Klebsiella ozaenae* gefunden wurde. SHV-2 unterscheidet sich von SHV-1, aus der Gruppe 2b, nur durch eine Aminosäure. Diese minimale Veränderung in der Struktur genügt, um die inaktivierende Wirkung des Enzyms auf Breitspektrum-Cephalosporine, wie Ceftazidim, zu erweitern (34).

### **3.2.1.3 OXA**

ESBLs vom OXA-Typ haben ihren Namen ihrem bevorzugten Substrat (Oxacillin) zu verdanken. Sie sind in der Bush-Jacoby-Medeiros Klassifikation in der Gruppe 2d und in der molekularen Klasse D zu finden. Repräsentative Enzyme sind OXA-1 bis OXA-11 (22). Obwohl sie Penicilline spalten können, werden sie, mit Ausnahme von OXA-10, wegen der fehlenden Aktivität gegenüber Breitspektrum-Cephalosporinen nicht als ESBL angesehen (34).

### **3.2.1.4 CTX-M**

Das erste Mal wurde CTX-M in München, Deutschland, aus einem Ohrabstrich von einem an Otitis media erkrankten Kleinkind isoliert. Es handelte sich um einen *Escherichia coli*-Stamm, dessen  $\beta$ -Laktamase sich von bis dahin bekannten SHV- und TEM-Enzymen, durch ihr Resistenzspektrum und Isoelektrischen Punkt deutlich abhebt (36). Obwohl dies die erste Beschreibung einer CTX-M  $\beta$ -Laktamase in der Literatur war, wurde bereits 1988 in Osaka, Japan, bei einem Hund, der in einem Labor zur Testung von Antibiotika verwendet wurde, ein

Cefotaxim-resistenter Bakterienstamm isoliert und dessen  $\beta$ -Laktamase als FEC-1, kurz für „Fecal *Escherichia coli*“, bezeichnet (37). Es zeigte sich bei späteren Untersuchungen, dass FEC-1 sich nur geringfügig von CTX-M-3, welches der CTX-M-1 Familie angehört, unterscheidet.

Es gibt zurzeit fünf Hauptgruppen bzw. Familien, im englischen auch als „Cluster“ bezeichnet, von CTX-M. Diese sind CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 und CTX-M-25. Zur Erläuterung: Alle  $\beta$ -Laktamasen, die in der gleichen Familie, z.B. CTX-M-1, eingeordnet sind, zeigen untereinander eine Verwandtschaft von über 97%. D.h. die  $\beta$ -Laktamasen unterscheiden sich von ihrem Aufbau untereinander in nur wenigen Aminosäuren (38). Es wird vermutet, dass die ersten CTX-M  $\beta$ -Laktamasen Abkömmlinge von chromosomal-kodierten  $\beta$ -Laktamasen von *Kluyvera* spp sind. Dieses Bakterium kommt als opportunistischer Krankheitserreger in der menschlichen Darmflora vor. Als Beispiel sei die  $\beta$ -Laktamase KLUG-1 von *Kluyvera georgiana* genannt, deren Aminosäuresequenz zu 99% mit der von CTX-M-8 übereinstimmt (39). CTX-M  $\beta$ -Laktamasen zeichnen sich vor allem durch ihre Resistenz gegen Cefotaxim aus, deshalb die Namensgebung. Resistenzen gegen Ceftazidim waren bei den ersten Bakterien, die dieses Enzym exprimierten, nicht üblich. Dies hat sich aber im Laufe der Zeit durch Auftreten von Punktmutationen in mobilen Genelementen, wie Plasmiden und Transposons, geändert (40).

### **3.2.1.5 Andere ESBL**

Es gibt auch noch seltener vorkommende ESBL, wie z.B.: PER, VEB-1, BES-1 und weitere.

### **3.2.2 Plasmidkodierte AmpC- $\beta$ -Laktamasen**

AmpC- $\beta$ -Laktamasen sind in der Bush-Jacoby-Medeiros Klasse 1 bzw. in der Ambler Gruppe C zu finden und sind durch Clavulansäure bzw. EDTA nicht hemmbar (22). Üblicherweise sind sie in einigen gramnegativen Bakterien, wie *Citrobacter*, *Serratia* und *Pseudomonas*, chromosomal kodiert und können durch Mutationen oder Überproduktion zu Resistenzen gegen Cephalosporine führen. Einige andere Bakterienarten, die AmpC im Chromosom tragen, wie *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus mirabilis*, sind auch in der Lage Cephalosporine abzubauen. Der Grund dafür sind AmpC-exprimierende Gene auf Plasmiden. Bakterien die AmpC exprimieren sind gegen Oxyimino- (Cefuroxim,

Cefotaxim, Ceftriaxon) und 7- $\alpha$ -Methoxycephalosporine (Cefoxitin, Cefmetazol, Cefotetan, Latamoxef, Flomoxef) sowie Monobaktame resistent (41).

### 3.2.3 Carbapenemasen

Carbapenemasen findet man in Gruppen der ESBL, AmpC-, OXA- und bei Metallo- $\beta$ -Laktamasen (VIM, IMP). In Österreich tragen Carbapenemase-produzierende Enterobakterien (CPE) vor allem Gene, die für KPC, NDM-1, VIM und OXA-48 codieren (42).

Tabelle 1 Schema für Einteilung von Carbapenemasen

Aktives Zentrum	Serine			Zink
Durch EDTA hemmbar	Nein			Ja
Molekulare Klassifikation (Vertreter)	A (ESBL)	C (AmpC)	D (OXA)	B (MBL)
Carbapenemase-Klassen	KPC	CMY	OXA-48	NDM, VIM, IMP, SIM-1, SPM-1 und GIM-1
Vorkommen	USA, Israel, Griechenland	-	Türkei, mittlerer Osten, Nordafrika	NDM: Indien, Pakistan, VIM, IMP: global

Nicht alle Bakterien, die resistent gegen Carbapeneme sind, produzieren Carbapenemasen. Für die Resistenz verantwortlich können auch Efflux-Pumpen und Veränderungen in der Poringröße sein. Zeigt im Routinelabor ein Enterobakterium eine verminderte Sensibilität gegenüber Meropenem im Agardiffusionstest, wird im Anschluss ein Meropenem Etest<sup>®</sup> zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) durchgeführt. Ist diese über 0,5 mg/L wird ein phänotypischer Bestätigungstest angeschlossen. Verwendet werden der modifizierte Hodge Test („Cloverleaf Test“) und der Rosco<sup>®</sup>-Test, ein Verfahren zum Nachweis des Synergismus von Meropenem zusammen mit Borsäure, Cloxacillin und Dipikolinsäure. In der Praxis sind diese Tests aber bei Produktion

mehrerer Carbapenemasen oder wegen gleichzeitigem Auftreten anderer Resistenzmechanismen schwierig zu interpretieren. Im Krankenhaus sollte v.a. bei Patienten mit Carbapenemase produzierenden Enterobakterien (CPE) und mit Auslandsaufenthalten in Risikoländern (wie in jüngster Zeit Kriegsoffer aus Lybien) in der Anamnese gescreent werden. CPE sind meist gegen alle  $\beta$ -Laktamantibiotika und Aminoglykoside resistent. Reserveantibiotika bleiben das stark nephrotoxische Colistin, Tigecyclin und evtl. Fosfomycin (42).

### **3.3 Epidemiologie**

Die folgenden Resistenzdaten wurden dem österreichischen Resistenzbericht AURES 2011 (43) und der Datenbank des „European Antimicrobial Resistant Surveillance Network“ (EARS-Net) (44) entnommen.

#### **3.3.1 E. coli**

Laut dem österreichischen Resistenzbericht AURES waren 2011 11,8% aller *E. coli*, d.h. sowohl invasive als auch nicht-invasive Isolate, ESBL-Bildner. 2010 waren es 10,3%. Der Anteil an invasiven ESBL-positiven *E. coli*-Isolaten betrug in Österreich laut EARS-Net 2011 9,1% (2010: 7,3%). Betrachtet man die Altersverteilung der Patienten mit invasiven *E. coli* Infektionen, die gegen 3. Generations-Cephalosporinen unempfindlich und damit wahrscheinlich ESBL-Bildner waren, dominierte die Altersgruppe der 15 bis 24-Jährigen. Diese Verteilung unterliegt jedoch großen jährlichen Schwankungen: 2010 war die Altersgruppe der unter 15-Jährigen am häufigsten betroffen, 2009 die 65 - 75-Jährigen, 2008 die 25 - 44-Jährigen. Bezüglich der Verteilung auf verschiedene medizinische Versorgungseinrichtungen fand man die vermeintlichen, invasiven ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate mit einer Prävalenz von ca. 11% am häufigsten auf urologischen, hämato-onkologischen Abteilungen und Intensivstationen. Im internationalen Vergleich lag Österreich bei den Resistenzraten von ESBL-bildenden, invasiven *E. coli* 2011 im europäischen Mittelfeld vor England und hinter Irland. Vorbildliche Resistenzraten zeigen die skandinavischen Länder Schweden, Norwegen und Finnland (43).

Abbildung 7 Europaweite Verteilung von 3. Generations Cephalosporin resistenten, invasiven *E. coli*-Isolaten (44)

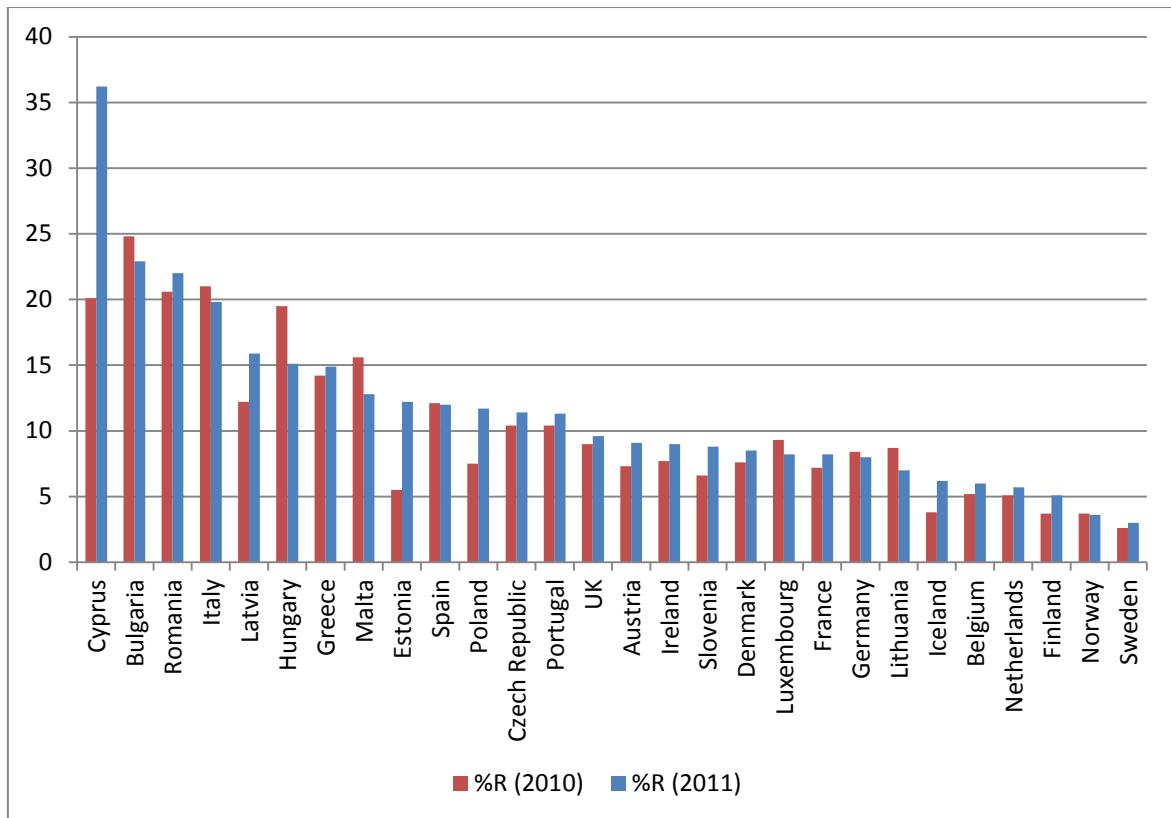
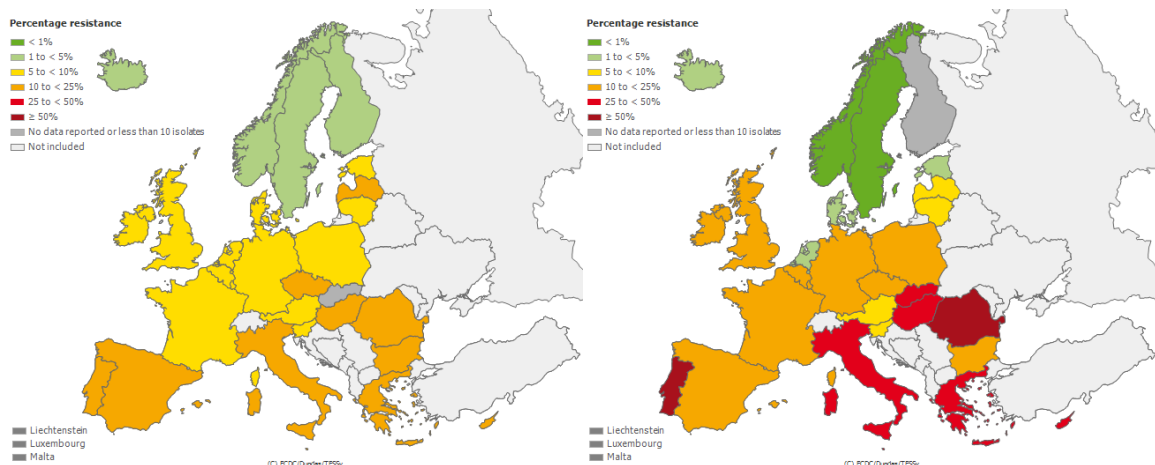


Abbildung 8 Europaweite Verteilung von invasiven, 3. Generations Cephalosporin resistenten *E. coli*-Isolaten 2010 (links) und 2011 (rechts) ©ECDC (44)



### 3.3.2 Klebsiella pneumoniae

2011 bildeten 13,3% aller invasiven *Klebsiella pneumoniae*-Isolate in Österreich ESBL. 2010 waren es noch 12,7% (+0,6%). Gegenüber dem Vorjahr konnte 2010 in allen Altersgruppen ein Anstieg von *K. pneumoniae*, die gegen 3. Generations-Cephalosporine resistent waren, verzeichnet werden. 2011 fand man,

wahrscheinlich wegen der geringen Fallzahl, in der Altersgruppe der unter 15-Jährigen den größten Anteil. In der Geschlechterverteilung sind überwiegend Männer von *K. pneumoniae*-Bakteriämien betroffen. 2011 hatten wieder pädiatrische Abteilungen wegen der niedrigen Fallzahlen den höchsten Anteil an 3. Generations-Cephalosporin-resistenten *K. pneumoniae*-Isolaten (9).

Abbildung 9 Europaweite Verteilung von 3. Generations-Cephalosporin resistenten, invasiven *Klebsiella pneumoniae*-Isolaten 2010/2011 (44)

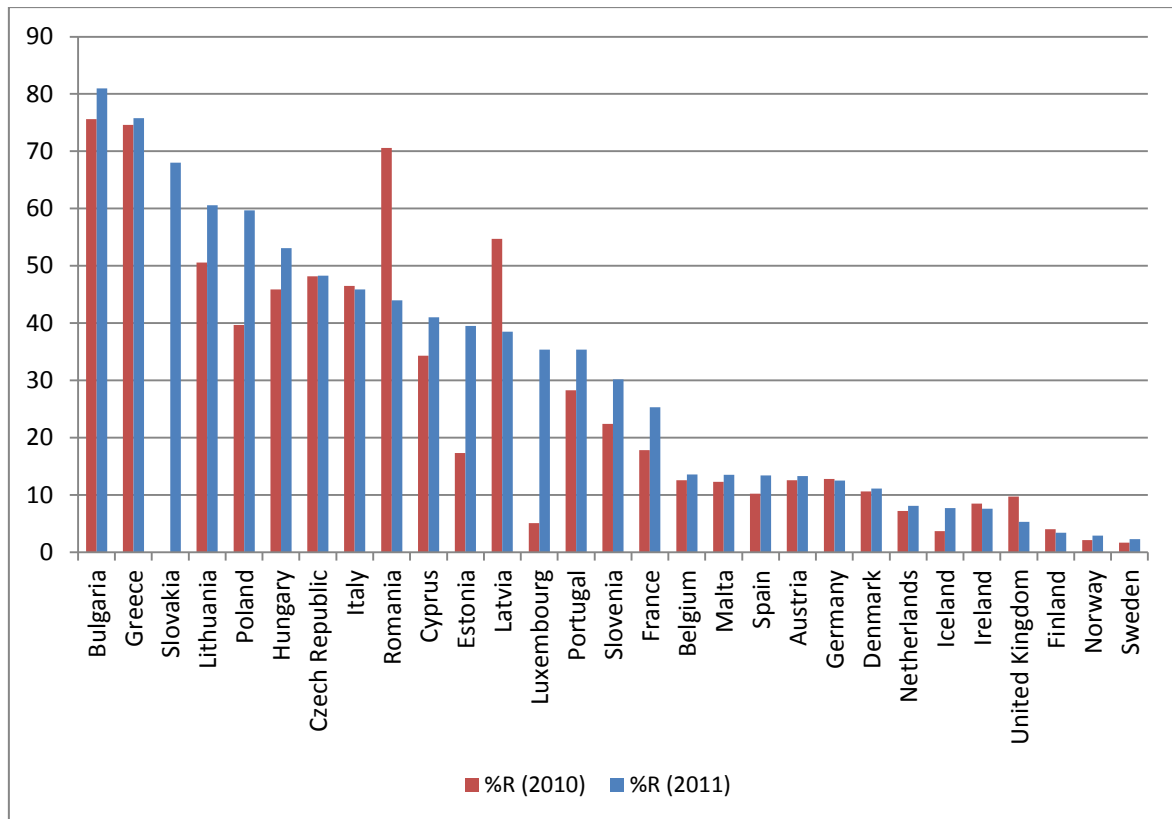
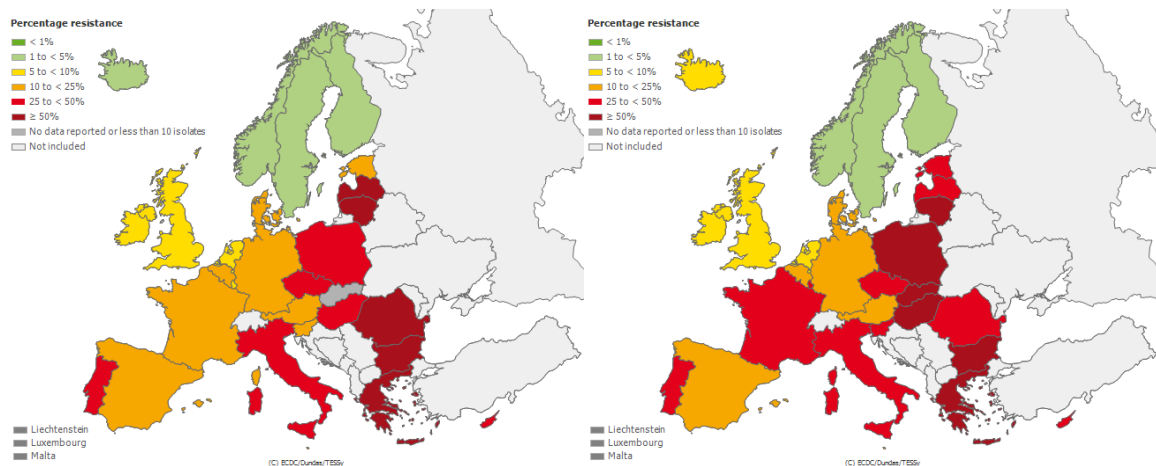


Abbildung 10 Grafische Darstellung der 3. Generations-Cephalosporin resistenten, invasiven *Klebsiella pneumoniae*-Isolate 2010 (links) und 2011 (rechts) © ECDC (44)



### **3.4 Hygienerichtlinien bei ESBL-Bildnern**

Zur Eindämmung der Verbreitung von ESBL-bildenden Bakterien wurden von der Medizinischen Universität Wien (45) und dem Institut für Krankenhaushygiene und Mikrobiologie (IKM) der KAGES (46) Hygienemaßnahmen bei Auftreten von multiresistenten gramnegativen Bakterien im Krankenhausbereich veröffentlicht. Die wichtigste Maßnahme ist die Durchführung einer regelmäßigen Händehygiene von Personal, PatientInnen und BesucherInnen, da ESBL-Bildner v.a. durch Kontakt verbreitet werden.

Ein Routinescreening jedes Patienten ist nicht notwendig, sollte aber bei einem ESBL-bildenden Keim in der Vorgeschichte des/der PatientIn durchgeführt werden. Ebenso sollten therapieresistente Harnwegsinfekte bei vorhandenem Dauerkatheter oder therapierefraktäre chronische Ulcera Anlass zum ESBL-Screening geben. Bestätigt sich bei einem solchen Screening der Verdacht auf ESBL, sollten noch weitere Proben aus möglichen Streuquellen abgenommen werden. Als Streuquellen kommen Stuhl bei Diarrhö, Harn bei Dauerkathetern, Wunden und Trachealsekret bei Beatmung bzw. Tracheostoma in Betracht. Es ist sinnvoll unter antibiotischer oder antiseptischer Behandlung den Therapieerfolg mit wöchentlichen Probenentnahmen zu überprüfen. Die Konsequenzen eines positiven ESBL-Screenings sind die strikte Einhaltung der Händehygiene, die Isolierung bzw. Kohortierung von ESBL-positiven PatientInnen, Tragen von Schutzkleidung bei medizinischen und pflegerischen Handlungen, regelmäßige Desinfektion und vorschriftsgemäße Entsorgung von patientennahen Gebrauchsgegenständen. Besonders wichtig ist auch die Einhaltung der Hygienerichtlinien bei Transferierung des/der PatientIn mit Krankentransporten. Eine ESBL Eradikation ist bei Nachweis im Stuhl nicht möglich, da Enterobakterien zur natürlichen Flora des menschlichen Darmes gehören. Sehr wohl können PatientInnen, bei welchen ESBL-Bildner in einer anderen Lokalisation vorhanden waren, nach entsprechender antibiotischer Behandlung und negativem Kulturergebnis, wieder aus der Isolation entlassen werden.

## 4 MRSA

### 4.1 Definition

*S. aureus* ist ein nicht sporenbildendes, unbewegliches, gram-positives Bakterium. Unter gewissen Umständen, wie z.B. bei Antibiotikagabe, können *S. aureus* Stämme durch Ausbildung strukturveränderter Zielmoleküle Resistenzen gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika entwickeln. Das verantwortliche Gen ist meist *mecA* (obwohl in jüngster Zeit auch *mecB* und *mecC*-Gene detektiert werden) das auf einem mobilen genetischen Element (SCC*mec*) lokalisiert ist.

### 4.2 Erkrankungen

Bei ca 37% der Bevölkerung kommt *S. aureus* als natürlicher Besiedler des Nasen-Rachen-Raumes vor. Bei Typ 2 Diabetikern, i.v. Drogenabhängigen und Hämodialyse-PatientInnen steigt die Wahrscheinlichkeit mit *S. aureus* besiedelt zu sein auf über 50%, wobei ein Drittel dieser Patientinnen im Laufe ihres Lebens eine Infektion entwickelt (47). Die Prävalenz mit MRSA kolonisiert zu sein liegt in der Bevölkerung bei unter einem Prozent (48). Risikofaktoren für eine Kolonisation sind lange, wiederholte Krankenhausaufenthalte und Therapien mit Breitspektrum-antibiotika. Im Krankenhaus werden 0,5 bis 1% aller neu aufgenommenen PatientInnen mit MRSA besiedelt (49).

Bei Infektionen kann es zu zahlreichen Krankheitsbildern kommen. Angefangen von Haut- und Weichteilinfektionen und Pneumonien bis hin zu Endokarditiden und Osteomyelitiden. Bei systemischer Streuung kann *S. aureus* eine Sepsis auslösen (50).

Man kann die durch Staphylokokken ausgelösten Krankheiten auch pathogenetisch in Krankheiten, die durch invasives Wachstum bedingt sind, und „toxinbedingte Krankheiten“ unterteilen; wobei bei einigen Krankheitsbildern beide Faktoren gleichzeitig eine Rolle spielen. Invasive Erkrankungen der Haut- und Schleimhäute (Furunkel, Karbunkel, Impetigo follicularis oder Mastitis puerperalis) können durch metastatische Absiedlung in tiefere Körperregionen vordringen. Innere Organe können nicht nur endogen, durch vorher genannte Erkrankungen, sondern auch exogen, nach Traumen oder Operationen mit *S. aureus* infiziert werden. Beispiele für exogene Infektionen sind Endokarditiden bei i.v.-Drogenabhängigen oder „Plastikinfektionen“ durch intravasale Katheter. Diese

können in Septikämien mit nachfolgendem systemischen Schock ausarten. Lebensmittelvergiftungen (Staphylokokken-Enteritis und –Enterokolitis) sind toxinvermittelte Erkrankungen, die durch hitzestabile Enterotoxine (A-E) verursacht werden. Einige Erkrankungen, wie die Dermatitis exfoliativa (Syn.: Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, Pemphigus neonatorum) und das Toxische Schocksyndrom, werden sowohl durch das invasive Wachstum, als auch durch die Toxinproduktion von *S. aureus* verursacht (13).

### **4.3 Pathogenitätsfaktoren**

Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor, welcher *S. aureus* von den weniger gefährlichen Arten, wie *S. epidermidis* und *S. saprophyticus*, unterscheidet, ist das Enzym Koagulase. Dieses ist auch labordiagnostisch von Bedeutung und im Blut des Menschen, über Aktivierung der Gerinnungskaskade, für die Bildung von Thromben verantwortlich. „Clumpingfaktor“, ein weiterer Virulenzfaktor, hat die gleiche Wirkung im Blutkreislauf und wird zum Schnellnachweis von *S. aureus* verwendet. Protein A ist ein zellwandständiges Protein, welches *S. aureus* ermöglicht, sich der Phagozytose durch Makrophagen, über Opsonierung von Immunglobulinen am F<sub>C</sub>-Fragment, zu entziehen (13). Protein A ist nicht nur als Virulenzfaktor, sondern auch bei der molekulargenetischen *spa*-Typisierung (*spa* Typing; „S-Type of Protein A“) von *S. aureus* von besonderer Bedeutung. Sie wird bei Ausbrüchen zur Rückverfolgung und genetischen Unterscheidung des auslösenden Bakterienstammes verwendet (51).

Panton-Valentine Leukocidin (PVL) ist ein Exotoxin, dass nach Sir Philip Noel Panton und Francis Valentine benannt ist und für CA-MRSA charakteristisch ist. Es wurde von einem Bakteriophagen, einem Virus das Bakterien befällt, in das Genom von *S. aureus* integriert. Dementsprechend wird der Genabschnitt im Bakterium auch als Prophage bezeichnet. PVL hat die Fähigkeit Leukozyten des Wirtes, über Porenbildung in der Membran, zu zerstören. CA-MRSA verursacht, vermutlich durch PVL Produktion, nekrotisierende Pneumonien mit aggressivem Krankheitsverlauf (50).

### **4.4 Resistenzmechanismen**

Es kann, z.B. unter Antibiotikagabe, zu einer Selektion von resistenten *S. aureus* - Stämmen kommen. Der Bekannteste ist der Methicillin-resistente *S. aureus*

(MRSA). Andere Bezeichnungen mit gleicher Bedeutung sind multiresistenter *S. aureus* (MRSA) oder Oxacillin-resistenter *S. aureus* (ORSA). Methicillin und Oxacillin werden nur in der Labordiagnostik zur Bestimmung der Methicillin-Resistenz eingesetzt und sind nicht als Antibiotika am Markt erhältlich. Weist ein *S. aureus* eine solche Methicillin-Resistenz auf, besitzt er am wahrscheinlichsten das *mecA*-Gen, welches für das Penicillin-bindende Protein PBP2a (Syn.: PBP2') codiert. PBP sind für die bakterielle Zellwandsynthese zuständig und gleichzeitig die Angriffspunkte für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. Produziert ein *S. aureus* dieses modifizierte PBP2a bleiben  $\beta$ -Laktamantibiotika wirkungslos und ist dann gegen alle gängigen Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme unempfindlich. Wirksam bleiben oft nur Glykopeptidantibiotika, wie Vancomycin und Teicoplanin. Inzwischen gibt es aber auch schon Stämme (*vanA*), die gegen diese „Reserve-Antibiotika“ resistent sind. Diese werden als Vancomycin-resistente *S. aureus* (VRSA) bezeichnet (52).

#### **4.5 CA, LA, HA (healthcare-associated, livestock-associated, hospital acquired)**

Die ersten MRSA wurden in den sechziger Jahren von hospitalisierten Patienten (HA-MRSA für „hospital-acquired“ oder „healthcare-associated“) isoliert (53). Die PatientInnen waren stationär, hatten in der Regel ein hohes Lebensalter und eine oder mehrere Begleiterkrankungen in der Anamnese. Jahre später fanden sich bei Infektionen von vorher gesunden Menschen MRSA-Stämme, die sich genetisch von den HA-MRSA unterschieden, die als „community-acquired“ MRSA (CA-MRSA) bezeichnet wurden. Betroffen waren v.a. jüngere Patienten, die keinen Kontakt zu Krankenhäusern hatten und bis zur Infektion gesund waren. CA-MRSA unterscheidet sich von HA-MRSA dadurch, dass letzterer eine größere *mec*-Kassette (Typ I, II oder III) trägt und zusätzlich zum normalen Resistenzmuster auch gegen zahlreiche nicht  $\beta$ -Laktam-Antibiotika resistent ist. CA-MRSA hingegen besitzt eine kleinere *mec*-Kassette (Typ IV oder V) und zeigt weniger Resistenzen gegen nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika. CA-MRSA produziert im Gegensatz zu HA-MRSA auch häufiger PVL (50).

In den USA kam es im Jahr 2000 zu CA-MRSA („USA300“) Ausbrüchen bei Athleten und Häftlingen. Dabei kam es vor allem zu Haut- und Weichteilgewebsinfektionen (53).

LA-MRSA („livestock-associated“) ist vor allem in der Nutztierhaltung ein Problem. Er ist Verursacher von Krankheiten bei Kühen, Schweinen und Hühnern. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass LA-MRSA auch Zoonosen beim Menschen verursachen kann. Es gibt Berichte, dass LA-MRSA auch eine asymptomatische Kolonisierung von Menschen verursachen kann (54). Umgekehrt wird auch angenommen, dass der Mensch eine Quelle neuer pathogener Stämme für Nutztiere sein kann. Der bekannteste LA-MRSA ist der vorwiegend beim Schwein vorkommende ST398. Es ist bekannt, dass dieser die Fähigkeit besitzt Menschen, v.a. Nutztierhalter, zu kolonisieren und zu infizieren (55). Es gibt auch Hinweise darauf, dass Haus- und Heimtiere, wie Hunde und Katzen, bei der Übertragung und als Reservoir von MRSA eine Rolle spielen (56).

#### **4.6 Genetische Klassifikation**

MRSA können mit vier verschiedenen Verfahren klassifiziert werden: Multi-Locus-Sequence Typing (MLST), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), *spa* Typing und *SCCmec* Typing. Neuere Klassifikationen verwenden eine Kombination aus den vorhergenannten Methoden. Als Beispiel wäre ST5-II zu nennen, wobei „ST5“ den in der MLST bestimmten klonalen Komplex (CC) und „II“ den *SCCmec*-Typ bezeichnet (53).

#### **4.7 Therapie**

Wegen der Resistenz von MRSA gegen fast alle gängigen  $\beta$ -Laktamantibiotika mangelt es oft an Behandlungsoptionen. Seit kurzem ist das neue MRSA-wirksame Breitspektrum-Cephalosporin Ceftarolin verfügbar. Vancomycin, ein Glykopeptid-Antibiotikum, wird seit langem als erste Wahl bei invasiven Infektionen mit MRSA verwendet. Alternativen sind Daptomycin, Linezolid, Teicoplanin, Tigecyclin und Telavancin. Bei komplizierter Bakteriämie, bei gleichzeitig vorliegender Endokarditis, wird gerne die Kombination aus Vancomycin und Rifampicin angewandt. Linezolid ist auf Grund von Studienergebnissen bei MRSA-Pneumonien überlegen. Bei ambulant erworbenen MRSA-Infektionen wird wegen der guten oralen Bioverfügbarkeit häufig Clindamycin eingesetzt. Knochen- und Weichteilinfektionen werden zusätzlich zum chirurgischen Débridement mit Daptomycin behandelt (57).

Auf der Suche nach neuen Therapien gegen MRSA wurden in einer Studie Pflanzenextrakte getestet. Dabei zeigte sich, dass die verwendeten Extrakte, u.a. aus den Blättern des indischen Basilikums (*Ocimum sanctum*), nicht nur allein angewandt, sondern auch synergistisch mit verschiedenen Antibiotika, eine gute *in-vitro* Wirkung gegen MRSA hatten (58).

#### 4.8 Epidemiologie

Laut dem österreichischen Resistenzbericht AURES betrug 2011 die Rate an invasiven MRSA 7,2%. Die Prävalenzen für nicht-invasiven MRSA betragen 2011 in Österreich im Spitalsbereich 5,8% (2010: 9,8%) und im niedergelassenen Bereich 3,7% (2010: 2,7%). Zusammengefasst ergibt dies eine Rate von 4,8% (2010: 7,9%) an nicht-invasiven MRSA-Isolaten.

Sowohl bei invasiven als auch bei nicht-invasiven *S. aureus*-Isolaten wurden 2011 keine Vancomycin-Resistenzen gefunden. Die höchsten Raten an invasiven MRSA finden sich auf Intensivstationen, chirurgischen, sowie internen Abteilungen. Männer sind häufiger von MRSA-Bakteriämien betroffen als Frauen (43).

Abbildung 11 MRSA Raten in Österreich von 2008 bis 2011 (43)

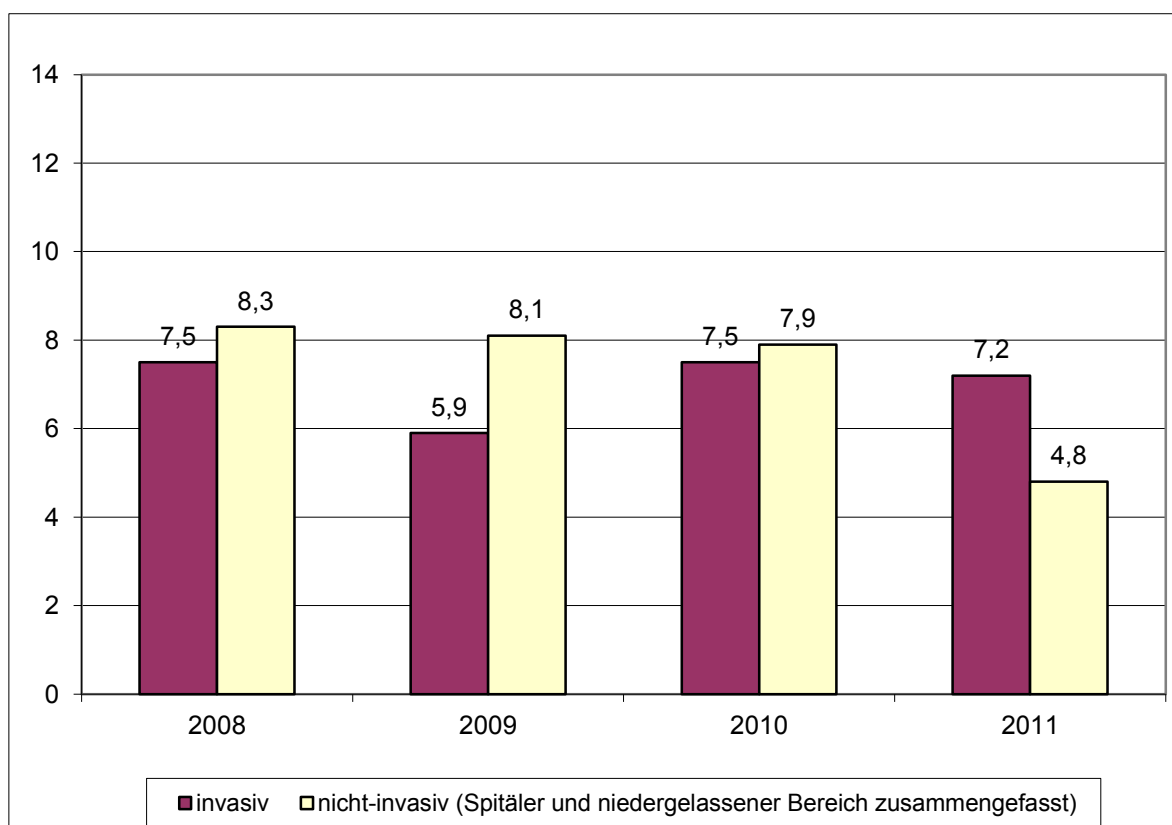
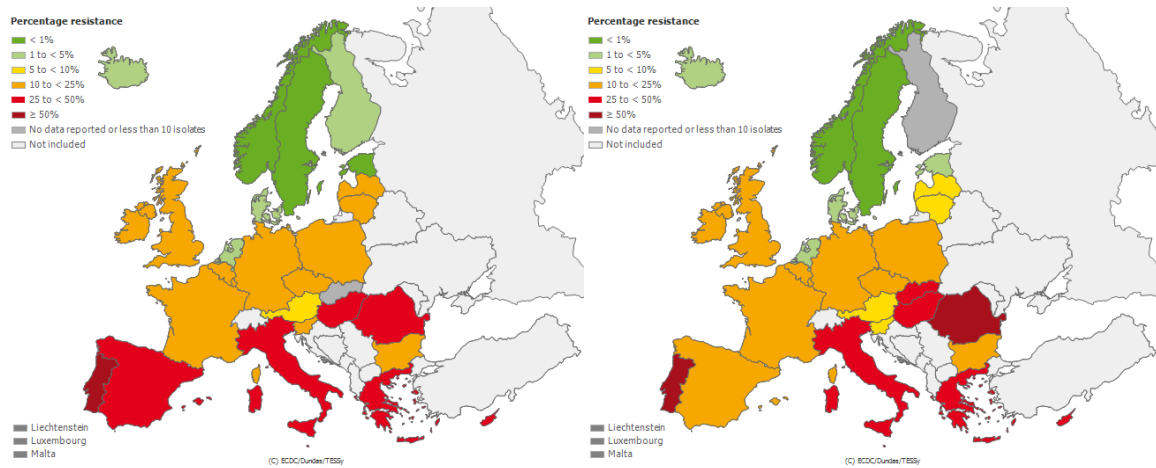
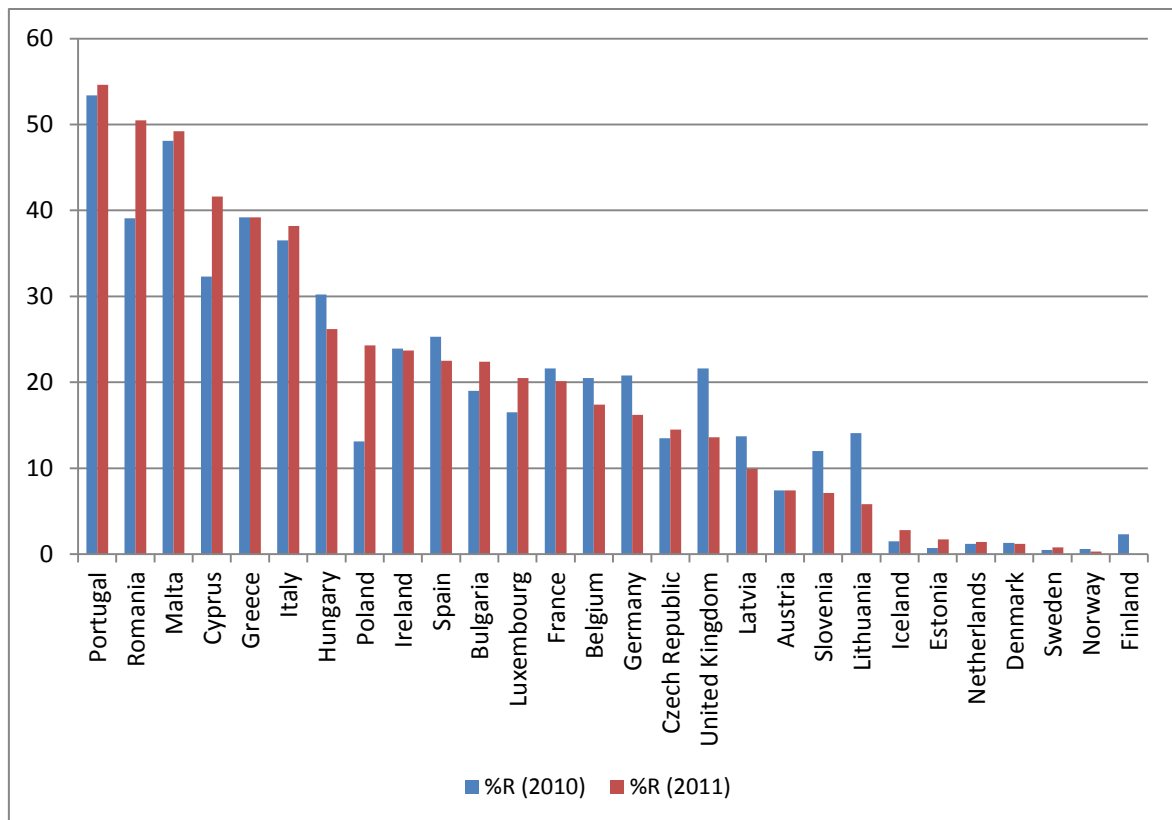


Abbildung 12 Vergleich der Prävalenzen von invasiven MRSA in Europa zwischen 2010 (links) und 2011 (rechts) © ECDC (44)



Österreich liegt bei den Raten an invasiven MRSA im Ländervergleich im unteren Drittel, vor Lettland und hinter Slowenien. Vorbildlich niedrige MRSA-Raten haben die skandinavischen Länder, sowie Dänemark und die Niederlande. In Portugal und Rumänien liegt der Anteil an MRSA an invasiven *S. aureus*-Bakteriämien bei über 50% (43).

Abbildung 13 Invasive MRSA Raten im Ländervergleich 2010 und 2011 (44)



## **4.9 Hygienerichtlinien bei MRSA**

Bei den Hygienerichtlinien der Medizinischen Universität Wien (49), die im Wesentlichen jenen der Krankenhaushygiene Graz (59) entsprechen, ist es zunächst wichtig, zu unterscheiden ob ein/e mit MRSA besiedelte/r Patient/in durch Kontakt (Gruppe A) oder über aerogenen Weg (Gruppe B) ein Infektionsrisiko für MitpatientInnen und Personal darstellt. Bei PatientInnen der Gruppe A erfolgt die Übertragung überwiegend durch die Hände des Personals. Eine Verbreitung ist aber auch über Instrumente, Verbandsmaterialien, Kleidung und Arbeitsflächen möglich. Bei dieser Risikogruppe A ist eine Isolierung in ein Einzelzimmer zwar wünschenswert, aber nicht zwingend erforderlich. Auf die Einhaltung der Händehygiene ist aber strikt zu achten. PatientInnen der Gruppe B, bei denen durch die Gefahr der Aerosolbildung (bei massiven Wundinfektionen, Infektionen der Atemwege oder schuppenden Hauterkrankungen) eine Verbreitung von MRSA in die Umgebungsluft möglich ist, müssen unbedingt isoliert werden. Jeder, der das Isolierzimmer betritt, ist verpflichtet eine Schutzkleidung (Handschuhe, langärmeliger textiler Schutzkittel, Gesichtsmaske) zu tragen. In Österreich ist nur bei Aufnahme von ehemaligen bzw. bekannten MRSA-Trägern oder zur Einschätzung des Ausmaßes der Besiedelung ein MRSA-Screening indiziert. Zur Durchführung der Eradikation wird Mupirocin (Bactroban®) drei Mal täglich über fünf Tage nasal appliziert. Bei Besiedlung der Haut werden Chlorhexidin-hältige Shampoos für Körper und Kopfhaar verwendet. Zur Überprüfung des Therapieerfolges muss für das neuerliche MRSA-Screening nach Therapieende zwei Tage zugewartet werden, um falsch-negative Ergebnisse durch Wirkstoffreste im Abstrich zu verhindern. Ein/e PatientIn kann nach drei negativen Abstrichen in Folge als MRSA-frei eingestuft werden.

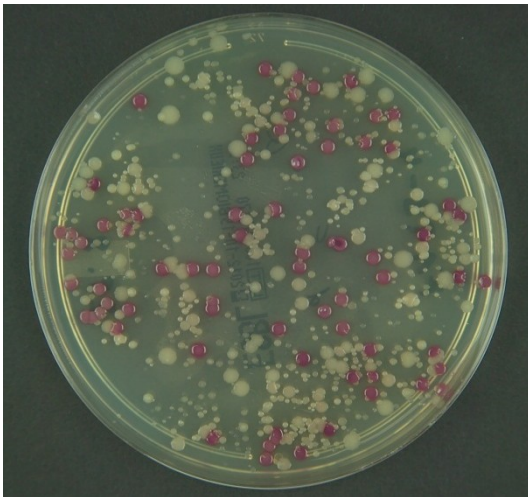
## 5 Material und Methoden

### 5.1 Arbeitsmaterialien und –geräte

#### 5.1.1 Agarplatten

Zum Erregernachweis wurden die Proben, nach Anreicherung in Peptonwasser auf selektive feste Nährmedien aufgetragen. Peptonwasser ist eine strohfarbene bis leicht orange, nichtselektive Nährlösung, die sich zur Vermehrung von *Enterobacteriaceae* aus Lebensmitteln und klinischen Proben eignet. Es enthält neben Peptonen, eine Mischung aus Peptiden und Aminosäuren, auch Natriumchlorid und hat einen leicht alkalischen pH von 7,2 (60).

##### 5.1.1.1 ESBL-Agar

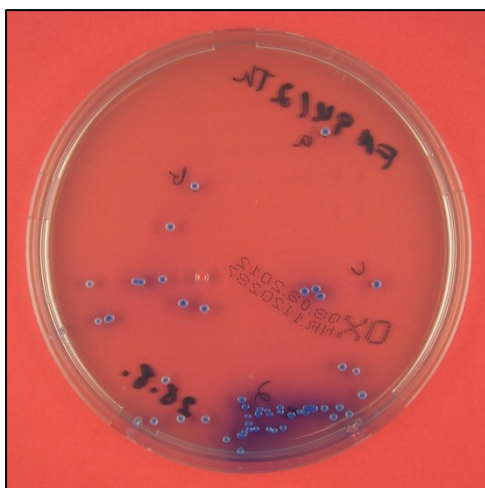


Für das Screening auf ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* wurde der chromID™ ESBL Agar der Firma bioMérieux verwendet. Dieser besteht aus einem Pepton-Gemisch und einer Antibiotikamischung, die unter anderem das 3. Generations-Cephalosporin Cefpodoxim enthält. Die Peptone dienen den Bakterien als Nährmedium, während die Antibiotika

ESBL-bildende Bakterien selektionieren. Zum Gebrauch ist folgendes zu beachten: Nachdem die Platten Raumtemperatur erreicht haben, kann man den Agar direkt mit der Probe beimpfen. Daraufhin werden die Nährböden für 18 bis 24 Stunden in einem Brutschrank bei 36°C in aerobem Milieu inkubiert. Danach kann man Kolonien nach Wachstum, Aussehen und Farbe beurteilen: Kolonien von *E. coli* sind rosa bis dunkelrot, von Bakterien der KESC-Gruppe (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) grün, braun-grün oder blau und *Proteaeae*, Bakterien der Art *Proteus*, *Morganella* oder *Providencia*, hellbraun bis dunkelbraun. Nachdem sich der Agar aber nur zum Screening eignet, muss die ESBL-Bildung noch durch andere Verfahren, wie z.B. Etests oder Agardiffusionstests bestätigt werden.

Obwohl das Screening recht einfach zu handhaben ist, hat der chromID™ ESBL Agar einige Limitierungen. Es gibt ESBL-bildende *E. coli* die keine  $\beta$ -Glucuronidase produzieren. Dieses Enzym ist für den rosa bis dunkelroten Farbumschlag notwendig. Die Konsequenz daraus ist, dass auch farblose Kolonien, die normalerweise verdächtig auf *Pseudomonadaceae* sind, geprüft werden müssen. Dies kann schnell mit dem Oxidase-Test (BD BBL™ DrySlide™ Oxidase) bestätigt werden. Dieser kann Cytochrom C in der Atmungskette von *Pseudomonadaceae* nachweisen. Bei positivem Ergebnis färbt sich der Teststreifen blau und lässt auf das Vorliegen von *Pseudomonadaceae* schließen. Falsch-positive Ergebnisse sind möglich, wenn Enterobakterien eine Cephalosporinase übermäßig produzieren oder eine High-level-Penicillinase bilden. Ebenso können atypische *Enterobacteriaceae*, wie *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* oder *Salmonella* spp, falsch-positive Resultate liefern. Diese können mit Hilfe des Indol-Tests rasch von *E. coli* unterschieden werden, der im Gegensatz zu den vorher genannten Bakterien das Reagenz (JAMES) bei positivem Ergebnis rosa bis rot färbt (61). In der täglichen Routinediagnostik ist es aber oft zeitsparender und kostengünstiger unklare Bakterienkolonien mit Hilfe von MALDI-TOF MS zu identifizieren.

### 5.1.1.2 OXA-Agar



Der OXA-Agar ist ein Selektivnährboden, der zum Screening auf MRSA verwendet wird. Er zeichnet sich durch eine besonders hohe Salzkonzentration aus, welche die Begleitflora hemmt. Ein Antibiotikamischung aus Oxacillin und Polymyxin B verhindert zudem das Wachstum von Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus* (MSSA) und *Proteus* spp. Die Agarplatten werden nach 24 Stunden

Bebrütung bei 37°C das erste Mal beurteilt. Zeigt sich kein ausreichendes Wachstum wird der Nährboden für weitere 24 Stunden inkubiert. MRSA-Kolonien imponieren durch eine intensive Blaufärbung auf einem farblosen Hintergrund (60). Bakterienarten, wie *S. epidermidis*, können falsch positive Resultate liefern.

Neuere MRSA Screening-Agar sind Brilliance™ MRSA der Firma Oxoid und chromeID™ MRSA von bioMérieux.

### 5.1.1.3 Endo-Agar

Zur Identifizierung und Isolierung von Enterobacteriaceae eignet sich kein Nährboden besser als der Endo-Agar. Er wurde schon 1904 zum Nachweis von *Salmonella typhi* eingesetzt. Für den Nachweis von Salmonellen gibt es aber inzwischen bessere Selektivagar-Platten, wie den XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) und RA (Rambach™)-Agar. Mit Hilfe des Endo-Agars können Laktose-positive von Laktose-negativen Bakterien unterschieden werden. Erstere bilden tiefrote Kolonien, *E. coli* zusätzlich mit metallischem Glanz. Laktose negative Keime präsentieren sich als farblose, durchscheinende Kolonien. Wegen der möglichen karzinogenen Wirkung des Farbstoffs Fuchsin, wird dieser dem Nährboden nur noch als Supplement zugegeben, um die Kontamination mit dem Staub der pulverartigen Substanz möglichst gering zu halten (60).

### 5.1.1.4 Blutagar

Wie der Name andeutet enthält dieser Universalagar Blut. Meist stammt dieses von Pferden oder Schafen. Am Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin wird dem Nährboden Humanblut zugesetzt. Blutagar wird im Routinelabor zur Anzüchtung anspruchsvoller grampositiver sowie gramnegativer Bakterien verwendet. Durch das enthaltene Blut können Bakterien mit Hämolyseverhalten gut differenziert werden (62).

Grüne bzw. grau-braune Zonen um Bakterienkolonien deuten auf eine  $\alpha$ -Hämolyse hin und kommen bei *Streptococcus viridans* (syn. Streptokokken der Viridans-Gruppe) oder *Streptococcus pneumoniae* („Pneumokokken“) vor. Ein klarer, durchscheinender, gelblicher Hämolysehof kommt bei *Streptococcus pyogenes* (Streptokokken der Gruppe A) und *Streptococcus agalactiae* (Streptokokken der Gruppe B) mit  $\beta$ -Hämolyse vor. Nicht hämolysierende Streptokokken und nicht hämolysierende Staphylokokken-Arten wachsen ohne spezifische Veränderung des Agars ( $\gamma$ -Hämolyse).

### **5.1.1.5 TSA-Agar (Tryptic Soya-Agar)**

Dieser Agar eignet sich zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl von aeroben Bakterien ohne besondere Wachstumsansprüche. Der Nährboden wird bei 37°C für 24 bis 48 Stunden bebrütet (63).

### **5.1.1.6 CNA-Agar (Colistin-Nalidixinsäure hältig)**

Der CNA-Agar wird zur Isolierung von anspruchsvollen, grampositiven Keimen verwendet. Durch den enthaltenen Zusatz von Schafblut kann zusätzlich das Hämolyseverhalten beurteilt werden. Gramnegative Bakterien und die meisten *Bacillus*-Arten werden durch die enthaltenen Antibiotika (Nalidixinsäure und Colistin) im Wachstum gehemmt (64).

## **5.1.2 MALDI-TOF MS**

MALDI-TOF MS ist ein neueres Verfahren zur Identifizierung von Bakterien mittels massenspektrometrischer Analyse von ribosomalen Proteinen. Es ist gegenüber früher angewandten biochemischen Analyseverfahren, wie der bunten Reihe oder API-Systemen, zeitsparender, in der Handhabung weniger komplex und kostengünstiger pro Probenanalyse. Zur Keimidentifizierung mittels MALDI-TOF MS wird ein geringes Inokulum ( $10^4$  bis  $10^6$  KBE) einer Bakterienkolonie auf ein Target, eine Stahlplatte mit kreisförmigen Aussparungen zum Auftragen der Proben, appliziert und in den Massenspektrometer eingebracht. In diesen wird von Pumpen ein Vakuum erzeugt und mit einem Laser die Probe blitzartig verdampft. Dabei laden sich ribosomale Proteine, wie die rDNA, im Bakterium elektrisch auf und können so durch Beschleunigung in einem Hochspannungsfeld detektiert werden. Durch Messung der Flugzeiten der detektierten Teilchen wird ein „massenspektrometrischer Fingerabdruck“ des Bakteriums erstellt, der nach Abgleich mit einer Datenbank ein Ergebnis liefert (65).

Probleme bei der Keimidentifizierung können bei *Streptococcus* spp, *Shigella* spp und *Propionibacterium acnes* auftreten (66).

### **5.1.3 VITEK<sup>®</sup> 2 (bioMérieux)**

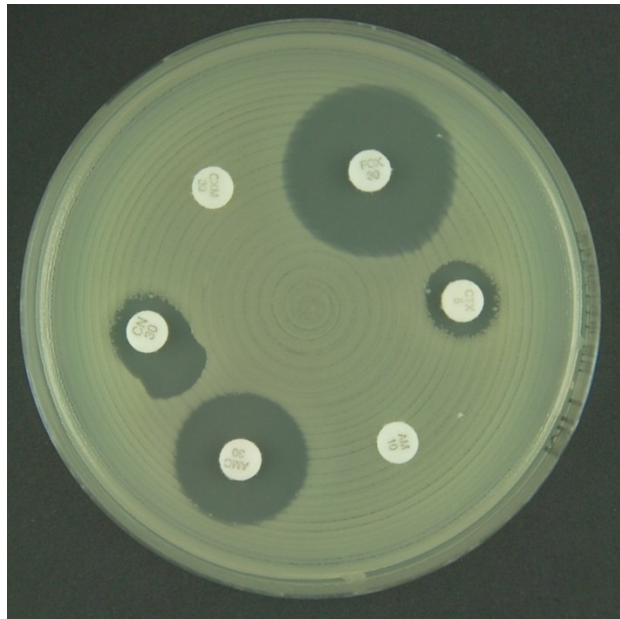
Mit Hilfe des Vitek<sup>®</sup> 2 Systems von bioMérieux wurden Bakterienstämme überprüft, die mit MALDI-TOF nicht identifiziert werden konnten. Das System wird in Kombination mit verschiedenen Testkarten verwendet. GP-Testkarten werden

bei grampositiven, GN-Testkarten bei gramnegativen Bakterien angewandt. Das Vitek<sup>®</sup> 2 Gerät eignet sich beim Einsatz entsprechender Testkarten auch zur Resistenztestung.

## 5.1.4 Resistenztestung

### 5.1.4.1 Agardiffusion

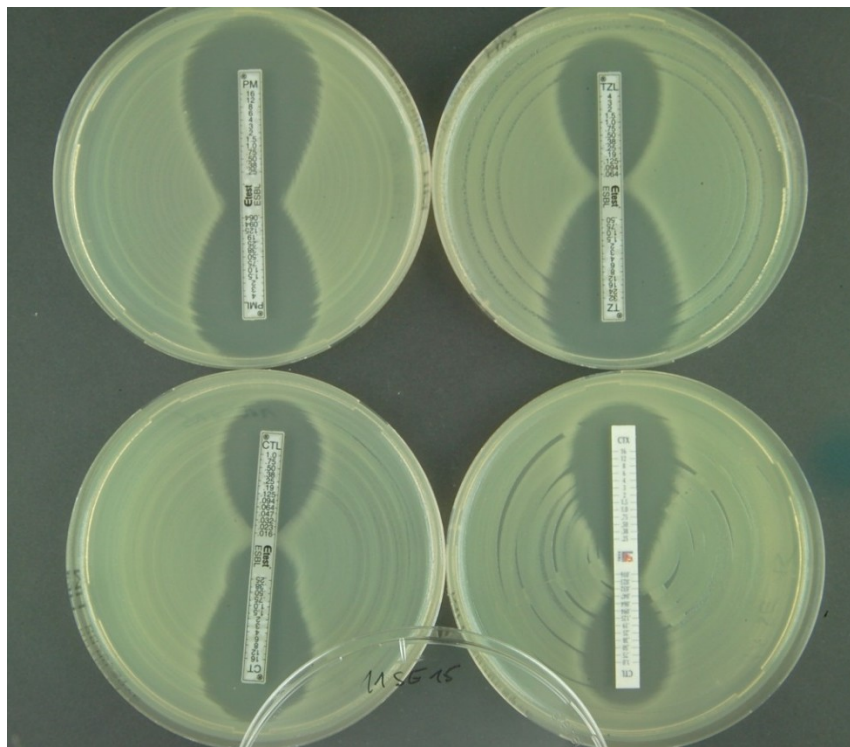
Der Agardiffusionstest, oder auch Blättchendiffusionstest, dient zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit von Mikroorganismen. Bei schnell wachsenden Keimen, wie *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp oder Staphylokokken, wird Müller-Hinton Agar verwendet. Bei anspruchsvolleren Bakterien, wie es die meisten Streptokokken und *Hämophilus* spp sind, verwendet man einen verbesserten Müller-Hinton-Agar (MH-F, wobei das „F“ für fastidious, zu Deutsch „anspruchsvoll“, steht), der zusätzlich 5% defibriniertes Pferdeblut und 20mg/L  $\beta$ -Nicotinamid Adenin Dinukleotid (NAD) enthält. Vor Gebrauch des Agars sollte dieser Raumtemperatur erreicht haben und trocken, d.h. frei von Kondenswasser sein. Ausgetrocknete oder vom Haltbarkeitsdatum abgelaufene Platten sind zu verwerfen. Zuerst wird eine Keimsuspension mit dem gewünschten Inokulum und einer 0,85%igen NaCl-Lösung hergestellt. Dabei sollte die Trübung der Lösung 0,5 McFarland entsprechen. Dies wird mit Hilfe eines Photometers überprüft und garantiert, dass die Anzahl der Keime für die Beimpfung des Agars im optimalen Bereich liegt. Die Suspension wird dann mit einem sterilen Baumwolltupfer gleichmäßig auf den Agar aufgetragen - idealerweise durch Sechsteln der Platte - oder mit einem Plattenrotator ausgestrichen. Danach werden die Antibiotikatestblättchen mit einem Suspenser auf den Agar aufgebracht und über Nacht unter geeigneten Bedingungen (36°C +/- 1°C) im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag können dann die Hemmhöfe um die Testblättchen abgemessen und das Resistenzverhalten des Keimes bestimmt werden. Wichtig bei dem gesamten Prozess ist die Einhaltung der 15-Minuten-Regel, d.h. zwischem dem Auftragen der Suspension auf den Agar, dem Stempeln der Antibiotikatestblättchen und dem Beginn der Inkubation sollten jeweils nicht mehr als 15 Minuten vergehen. Andernfalls könnte der Agardiffusionstest falsche Ergebnisse liefern (67).

Abbildung 14 Agardiffusionstest eines *E. coli*-Stammes

### 5.1.4.2 Etest® (bioMérieux)

Bei Etests® handelt es sich um Plastikstreifen mit fest definierten Antibiotikakonzentrationen zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Die Streifen werden gleich wie die Antibiotikatestplättchen auf eine beimpfte Agarplatte gelegt und je nach Ansprüchen des Keimes über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Abbildung 15 Verschiedene Etest®-Streifen. PM/PML (Cefepim/Cefepim + Clavulansäure), TZ/TZL (Ceftazidim/Ceftazidim + Clavulansäure), CT/CTL (Cefotaxim/Cefotaxim + Clavulansäure)



### 5.1.5 Molekulargenetische Methoden

Die Bestimmung der  $\beta$ -Laktamase (*bla*)-Gene von phänotypisch ESBL-positiven Bakterien und die *spa*-Typisierung von MRSA wurden von Dr. rer. nat. Zarfel Gernot durchgeführt. Methoden der Wahl waren Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung. Bei ESBL-Bildnern wurde in der PCR nach den fünf häufigsten  $\beta$ -Laktamase Familien (TEM, SHV, CTX-M, VEB und GES) gescreent.

### 5.2 Arbeitsprocedere

Im Zeitraum von September 2011 bis September 2012 wurden im Großraum Graz 100 tierische Lebensmittelproben, im speziellen gemischtes Faschiertes, aus Rind- und Schweinefleisch, auf das Vorhandensein von ESBL bildenden *E. coli*, *Klebsiella* spp und MRSA untersucht. Die Proben wurden in einer Kühlbox bei einer Temperatur von 4-8° Celsius innerhalb von 60 Minuten an das Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin transportiert, dort in Kühlschränken bei 4-8° Celsius zwischengelagert und innerhalb von 24h für nachfolgende Untersuchungen bearbeitet.

Die Untersuchungsschritte richten sich nach der ÖNORM EN ISO 6887-2 von 2004 („Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen. Teil 2: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fleisch und Fleischerzeugnissen“). Sie entspricht der deutschen Fassung der ISO-6887-2, die vom Europäischen Komitee für Normung 2003 angenommen wurde und dient zur Vereinheitlichung der Untersuchung von Fleischproben für mikrobiologische Zwecke auf europäischer Ebene.

#### 1.Tag

#### **Screening auf ESBL-bildende Keime und MRSA, sowie Bestimmung der Gesamtkeimzahl**

25g der Lebensmittelprobe werden in 225g Peptonlösung für 2 Minuten im Stomacher® 400 Lab-Blender homogenisiert (entspricht der Verdünnung  $10^{-1}$ ). Anschließend werden die Proben im Erlenmeyerkolben (kegelförmige Glaskolben) für 15 Minuten bei 37° Celsius und 150 upm im Schüttelinkubator durchmischt. Danach wird eine Verdünnungsreihe (1:10) mit 4,5 mL NaCl und 0,5 mL der Probe

von  $10^{-2}$  bis  $10^{-4}$  ( $10^{-1}$  Verdünnung = Peptonlösung) hergestellt und jeweils 100  $\mu\text{L}$  der entstandenen Lösung auf folgende Agar Platten ausgestrichen:

**Tabelle 2 Agarplatten für quantitativen Keimnachweis. Verdünnungen die mit X gekennzeichnet sind, wurden auf den jeweiligen Agar ausgestrichen.**

Verdünnung \ Agar	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
CNA	X	X	X
ENDO	X	X	X
TSA		X	X

Der TSA-Agar dient zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl, der Endo-Agar zur Bestimmung der Anzahl an gramnegativen Bakterien und der CNA-Agar zum quantitativen Nachweis von grampositiven Keimen. Die beimpften Agar-Platten und Thioglykolat-Röhrchen werden bei  $37^\circ$  Celsius über Nacht (16-24h) im Brutschrank bebrütet. Um so viele Keime wie möglich durch das Screening-Verfahren zu erfassen, wird die Nativprobe in der Peptonlösung über Nacht in einem Schüttelinkubator bei  $37^\circ$  Celsius und 150 upm angereichert.

## 2.Tag

### Screening auf ESBL-bildende Keime und MRSA

Von der angereicherten Peptonlösung wird eine Verdünnungsreihe bis  $10^{-4}$  hergestellt, wobei es sich bei der  $10^{-1}$  Verdünnung um die inkubierte Peptonlösung handelt. Von den Verdünnungen werden jeweils 100  $\mu\text{L}$  auf folgende Agarplatten ausgestrichen:

**Tabelle 3 Agarplatten für qualitativen Nachweis multiresistenter Keime.**

Verdünnung \ Agar	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
ESBL	X	X	X	X
OXA (48h)	X	X		
ENDO	X	X	X	X

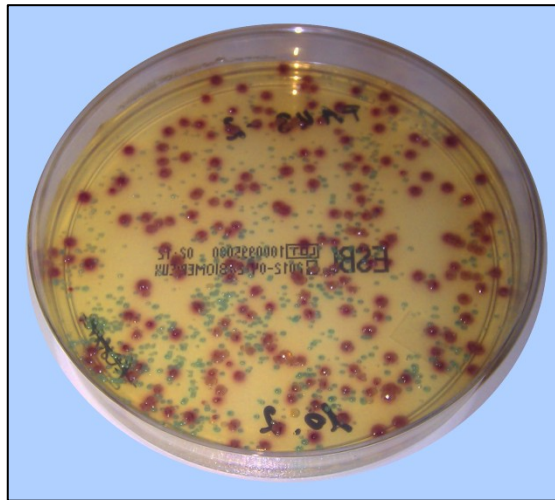
Es werden jeweils ca 10  $\mu\text{L}$  mittels Tupfer aus den bebrüteten Thioglykolat-Röhrchen auf jeweils eine OXA-, ESBL- und ENDO-Agarplatte ausgestrichen. Aus der 24h inkubierten Peptonwasser-Anreicherung werden zwei Proben, eine Arbeits- und eine Reserveprobe, jeweils in einem Verhältnis von 1:1 (5mL/5mL)

mit Glycerin gemischt und für spätere Untersuchungen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt aufbewahrt. Die Keimzahlen werden von allen, am Vortag hergestellten, bebrüteten Agarplatten notiert.

### 3.Tag

Rote (*E. coli*-Verdacht) und türkisfarbene (Verdacht auf *Klebsiella* spp) Kolonien auf ESBL-Agarplatten (Abbildung 16), die am Vortag ausplattiert wurden, werden mit Impfösen auf Blut-Agarplatten überimpft und 24h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Dieser Schritt wird so lange wiederholt bis man eine Reinkultur des gewünschten Keimes erhält.

Abbildung 16 ESBL Screening Agar mit kleinen, türkisfarbenen (Verdacht auf *Klebsiella* spp) und größeren, rötlichen (Verdacht auf *E. coli*) Kolonien



### 4.Tag

#### Screening auf ESBL-bildende Keime und MRSA

Die selektierten Kolonien werden von den bebrüteten Blutagarplatten mittels MALDI-TOF MS Axima<sup>TM</sup> Assurance (Shimadzu, Japan) identifiziert. Kann die Untersuchung keine eindeutige Identifikation des Keims liefern, erfolgt die Keimanalyse nach vorhergehender Gramfärbung mit dem VITEK<sup>®</sup>2-System. Zur endgültigen Bestätigung der ESBL-Produktion, werden folgende Resistenztestungen durchgeführt:

Tabelle 4 Antibiotikastempel mit den getesteten Substanzen für *Enterobacteriaceae* \*) Nur für die Behandlung von unkomplizierten Harnwegsinfekten geeignet (68) \*\*) Nach den CLSI-Richtlinien 2011 (2) \*\*\*) Gilt nur für *E. coli*, *Klebsiella* spp und *Proteus mirabilis*

Resistenzstempel	Abkürzung	Antibiotikum	sensibel ≥ (in mm)	resistent < (in 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
	MXF 5	Moxifloxacin	20	17
	CIP 5	Ciprofloxacin	22	19
	SXT 1,25+23,75	Trimethoprim/Sulfamethoxazol (Cotrimoxazol)	16	13
	GM 10	Gentamicin	17	14
	-III	AN 30	Amikacin	16
MEM 10		Meropenem	22	16
IPM 10		Imipenem	22	16
FEP 30		Cefepim	24	21
CAZ 10		Ceftazidim	22	19
TGZ 15		Tigecyclin	18 <sup>E.coli</sup>	15 <sup>E.coli</sup>
-IV	TE 30	Tetracyclin	15**	12**
	C 30	Chloramphenicol	17	17
	NA 30	Nalidixinsäure (Screening)	19**	14**
CLSI*** (DD-Synergietest)	CAZ CAZ/CLA CTX CTX/CLA	Ceftazidim Ceftazidim + Clavulansäure Cefotaxim Cefotaxim + Clavulansäure	Bei einer Differenz der Hemmhof-Durchmesser von ≥ 5mm besteht ein phänotypischer ESBL-Verdacht.	

Tabelle 5 Resistenztestungen für *Staphylococcus spp* (68)

Resistenz- stempel	Abkürzung	Antibiotikum	sensibel ≥ (in mm)	resistent < (in mm)
+ I	P 1	Penicillin	10	10
	FOX 30	Cefoxitin	22	22
	TE 30	Tetracyclin	22	19
	E 15	Erythromycin	21	18
	CC 2	Clindamycin	22	19
	NOR 10	Norfloxacin	17	17
+ II	GM 10	Gentamicin	22	22
	SXT 1,25+23,75	Trimethoprim/Sulfa- methoxazol (Cotrimoxazol)	17	14
	FA 10	Fusidinsäure	24	24
	RA 5	Rifampicin	26	23
	LZD 10	Linezolid	19	19
	MUP 200	Mupirocin	30	18

Bei unklarem Resistenzmuster werden zusätzlich MHK-Bestimmungen mittels Etests<sup>®</sup> (bioMérieux) durchgeführt.

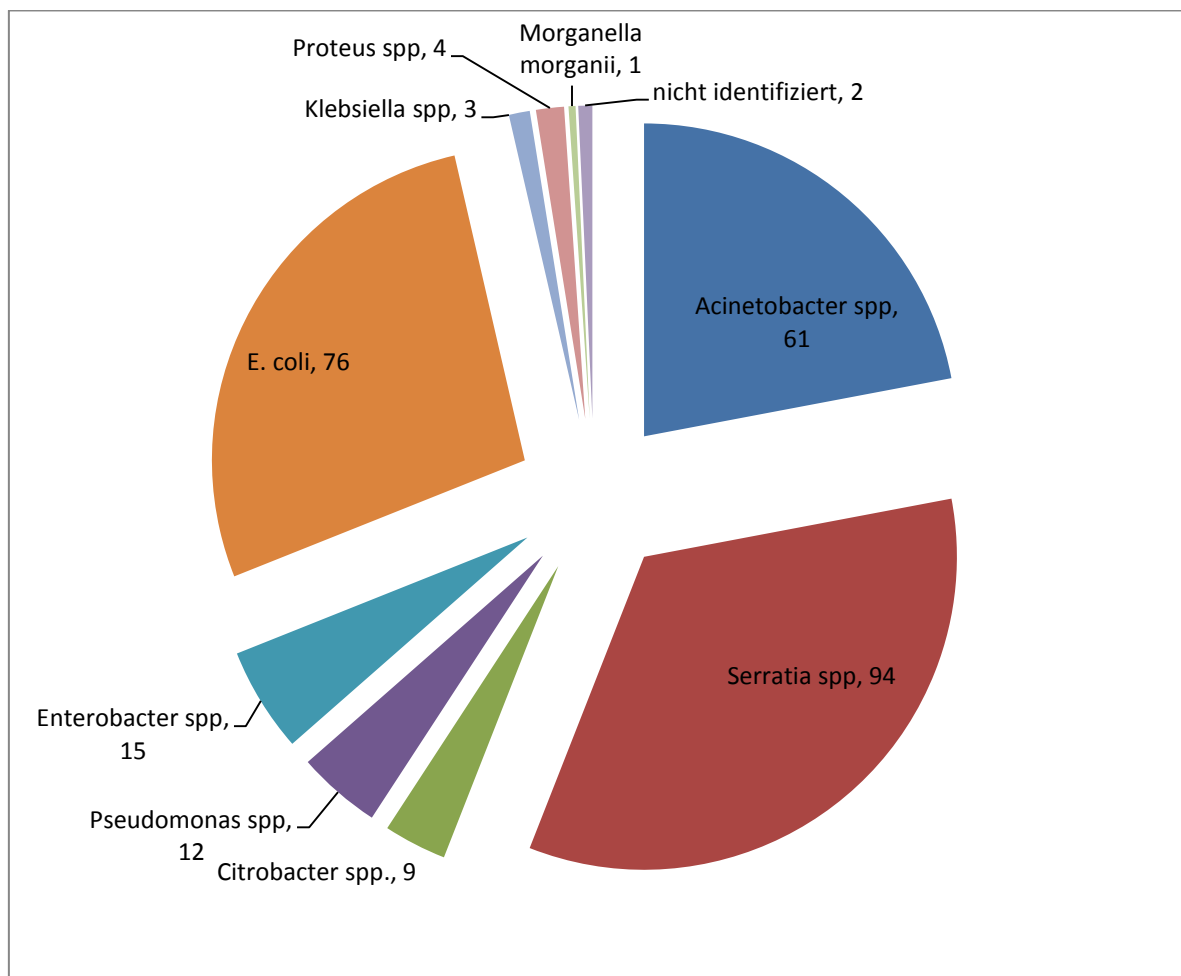
Als ESBL-Bildner bestätigte Bakterien werden in einer Lösung aus 500 µl Glycerin und 500 µl NaCl bei -80°C tiefgefroren und archiviert.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 ESBL-produzierende gramnegative Bakterien

Insgesamt wurden von den 100 Fleischproben 277 Keime von ESBL-Selektivagar isoliert (Abbildung 17, Tabelle 6) und auf Antibiotikaempfindlichkeiten geprüft. Darunter fanden sich Bakterien aus den Gruppen der Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae und *Acinetobacter* spp. 65 dieser 277 Isolate waren phänotypisch im CLSI-Bestätigungstest ESBL-Produzenten. Bei 38 *E. coli*-Isolaten konnte genotypisch eine ESBL-Produktion nachgewiesen werden. Diese 38 ESBL-bildenden Isolate wurden in 20 der 100 Fleischproben gefunden. Der Anteil an ESBL-bildenden *E. coli* ist möglicherweise aber höher als 38, weil Isolate von derselben Probe und gleichem Resistenzmuster aus Zeit- und Kostengründen nur einmal genotypisch auf ESBL-Gene untersucht worden sind. Insgesamt waren 65 *E. coli* Isolate im CLSI-Bestätigungstest phänotypische ESBL-Produzenten.

Abbildung 17 Verteilung der isolierten Bakterien im faschierten Fleisch.



Die in Abbildung 17 dargestellte Verteilung spiegelt allerdings nicht die tatsächliche Keimverteilung in faschiertem Fleisch wider, da die Bakterien von ESBL-Selektivnährböden abgenommen wurden. Außerdem überleben durch den Kühlungsprozess meist nur psychrophile Bakterienarten (Pseudomonaceae, *Aeromonas* spp, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp), deren Wachstumsoptimum zwischen 5 und 10°C (Minimum: -5°C, Maximum: 20°C) liegt. So kommt es zu einer elektiven Verschiebung der Keimflora in gekühlten Lebensmitteln. Dieser Effekt wird durch die CO<sub>2</sub>- oder N-haltige Schutzatmosphäre im abgepackten Fleisch verstärkt. So sind häufig nur noch gramnegative Bakterienarten, wie *Pseudomonas* spp, *Aeromonas* spp, *Acinetobacter* spp und Enterobacteriaceae in gekühltem Fleisch vorhanden (69).

**Tabelle 6 Art und Anzahl der Isolate, die von ESBL-Selektivagar überprüft wurden. \*) Konnten weder durch MALDI-TOF MS, noch durch VITEK-2 bestimmt werden.**

Bakterienart	Isolate	ESBL positiv (phänotypisch)	ESBL-positiv (genotypisch)
<i>Serratia</i> spp	94	0	0
<i>E. coli</i>	76	65	38
<i>Acinetobacter</i> spp	61	0	0
<i>Enterobacter</i> spp	15	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp	12	0	0
<i>Citrobacter</i> spp	9	0	0
<i>Proteus</i> spp	4	0	0
<i>Klebsiella</i> spp	3	0	0
<i>Morganella morganii</i>	1	0	0
Nicht identifizierbare Keime*	2		
Summe	277	65	38

### 6.1.1 *Serratia* spp

Am häufigsten wurden *Serratia* spp (n=94) isoliert. Davon waren alle, bis auf eine *S. liquefaciens*, von der Art *S. fonticola*. Stichprobenartige, genotypische Untersuchungen ausgewählter *Serratia* spp-Isolate auf ESBL-Gene blieben negativ. Hohe Resistenzraten wurden bei Ampicillin (93,6%), Cefalexin (84%) und Cefuroxim (100%) gefunden (Tabelle 7). *S. fonticola* besitzt jedoch intrinsische Resistenz gegen Penicilline (Benzylpenicillin, Oxacillin, Amoxicillin, Ticarcillin), Cephalosporine (Cefaclor, Cefazolin, Loracarbef, Cefuroxim, und Cefpodoxim),

Makrolide (Erythromycin, Roxithromycin, Clarithromycin), Lincosamide, Streptogramine, Glykopeptide und andere Antibiotika (Rifampicin, Fusidinsäure) (70). Dies würde die vorher genannte Resistenz gegen Ampicillin, Cefalexin und Cefuroxim (und das Wachstum auf der ESBL-Screening Platte) erklären.

**Tabelle 7 Anzahl und Resistenzraten der *Serratia* spp, S=sensibel, I= intermediär resistent, R= resistent \*) Nur beim unkomplizierten HWI \*\*) Validierung nur durch Bestimmung der MIC möglich (EUCAST 3.0)**

		Serratia spp (n=94)				
		Anzahl S	Anzahl I	Anzahl R	Anzahl R+	% R+I
<b>Penicilline</b>						
Ampicillin	AM	6	0	88	88	93,6%
Amoxicillin/Clavulansäure	AMC	64	0	30	30	31,9%
Piperacillin/Tazobactam	TZP	94	0	0	0	0%
<b>Cephalosporine</b>						
Cefalexin*	CN	15	0	79	79	84,0%
Cefuroxim	CXM	0	0	94	94	100,0%
Cefoxitin	FOX	75	0	19	19	20,2%
Cefotaxim	CTX	65	11	18	29	30,9%
Ceftazidim	CAZ	92	2	0	2	2,1%
Cefepim	FEP	94	0	0	0	0%
<b>Carbapeneme</b>						
Imipenem	IPM	94	0	0	0	0%
Meropenem	MEM	94	0	0	0	0%
<b>Aminoglykoside</b>						
Gentamicin	GM	94	0	0	0	0%
Amikacin	AN	94	0	0	0	0%
<b>Fluorchinolone</b>						
Ciprofloxacin	CIP	94	0	0	0	0%
Moxifloxacin	MXF	94	0	0	0	0%
<b>sonstige</b>						
Tetracyclin	TE	92	2	0	2	2,1%
Nalidixinsäure	NA	94	0	0	0	0%
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	SXT	94	0	0	0	0%
Tigecyclin**	TGC	94	0	0	0	0%
Chloramphenicol	C	87	0	7	7	7,4%

### 6.1.2 *E. coli*

Am zweithäufigsten wurden von dem ESBL-Selektivagar *E. coli*-Stämme (n=76) isoliert. Von 38 genotypisch als ESBL-Bildner bestätigten *E. coli*-Isolaten wurden Resistenztestungen (Tabelle 8) durchgeführt. Dabei wurden alle Isolate – auch jene mit sich deckendem Resistenzmuster und die aus der gleichen Probe stammten – zusammengefasst.

Resistenzen gegen 2.- (Cefuroxim), 3.- (Cefotaxim, Ceftazidim) und 4.- (Cefepim) Generations-Cephalosporine sind kennzeichnend für die isolierten ESBL-bildenden *E. coli*. Kein einziger der 38 ESBL-positiven Stämme war gegen

Ampicillin oder Cefuroxim empfindlich. 97,4% (n=37) der ESBL-positiven Stämme waren gegen das 3. Generations-Cephalosporin Cefotaxim resistent. Zählt man die intermediär sensiblen *E. coli*-Isolate hinzu, hatten alle ESBL-positiven Stämme eine verminderte Empfindlichkeit gegen Cefotaxim. Amoxicillin/Clavulansäure und Cefoxitin zeigen bei ESBL-positiven *E. coli* eine ausgezeichnete Wirksamkeit. Dies ist ein charakteristisches Merkmal von ESBL-Bildnern: Neben Penicillin-Inhibitor Kombinationen (Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin/Tazobactam) und Cephamycinen (Cefoxitin) werden auch Carbapeneme (Imipenem, Meropenem) von ESBL in ihrer Wirksamkeit nicht eingeschränkt. Vier ESBL-positive *E. coli* (10,5%) waren gegen Gentamicin resistent. Unempfindlichkeiten gegen Fluorchinolone, wie Ciprofloxacin (5,3%) und Moxifloxacin (13,2%) waren selten. Erfreulicherweise wurden keine Carbapenem-resistenten *E. coli* gefunden.

**Tabelle 8 Anzahl und Resistenzraten der *E. coli*, S=sensibel, I= intermediär resistent, R= resistent \*) Nur beim unkomplizierten HWI \*\*) Validierung nur durch Bestimmung der MIC möglich (EUCAST 3.0)**

		ESBL-bildende <i>E. coli</i> (n=38)				
		Anzahl S	Anzahl I	Anzahl R	Anzahl R+I	% R+I
<b>Penicilline</b>						
Ampicillin	AM	0	0	38	38	100,0%
Amoxicillin/Clavulansäure	AMC	37	0	1	1	2,6%
Piperacillin/Tazobactam	TZP	37	1	0	1	2,6%
<b>Cephalosporine</b>						
Cefalexin	CN	7	0	31	31	81,6%
Cefuroxim	CXM	0	0	38	38	100,0%
Cefoxitin	FOX	38	0	0	0	0%
Cefotaxim	CTX	0	1	37	38	100,0%
Ceftazidim	CAZ	19	10	9	19	50,0%
Cefepim	FEP	13	15	10	25	65,8%
<b>Carbapeneme</b>						
Imipenem	IPM	38	0	0	0	0%
Meropenem	MEM	38	0	0	0	0%
<b>Aminoglykoside</b>						
Gentamicin	GM	34	0	4	4	10,5%
Amikacin	AN	38	0	0	0	0%
<b>Fluorchinolone</b>						
Ciprofloxacin	CIP	36	0	2	2	5,3%
Moxifloxacin	MXF	33	3	2	5	13,2%
<b>sonstige</b>						
Tetracyclin	TE	14	0	24	24	63,2%
Nalidixinsäure	NA	31	3	4	7	18,4%
Cotrimoxazol	SXT	30	1	7	8	21,1%
Tigecyclin	TGC	38	0	0	0	0%
Chloramphenicol	C	37	0	1	1	2,6%

In den phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigten *E. coli* wurden folgende  $\beta$ -Laktamase-Gene gefunden:

**Tabelle 9 Aufschlüsselung der Proben mit ESBL-positiven *E. coli* Stämmen und der detektierten  $\beta$ -Laktamasen.**

Positive Proben	CTX-M-1	CTX-M-1/TEM-1	CTX-M-14	CTX-M-32/TEM-1	TEM-52	SHV-12
FA-1	x					
FA-2	x					
FA-3	x					
<b>FA-4</b>	x			x		
FA-5	x					
FA-6					x	
FA-7	x					
FA-8					x	
FA-9	x					
FA-10	x					
FA-11		x				
FA-12	x					
FA-13	x					
FA-14	x					
FA-15	x					
FA-16	x					
FA-17	x					
<b>FA-18</b>	x		x			x
FA-19	x					
FA-20			x			
<b>20 Proben</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

Der häufigste ESBL-Typ, der in 16 Proben gefunden wurde, war CTX-M-1 (Tabelle 9, Abbildung 18, Abbildung 19). Einer dieser Stämme hatte TEM-1 als zusätzliche  $\beta$ -Laktamase. In zwei Proben wurde jeweils ein CTX-M-14 positiver *E. coli* Stamm gefunden. Eine weitere Probe wurde positiv auf einen CTX-M-32/TEM-1 exprimierenden *E. coli* Stamm getestet. TEM-52 konnte in zwei Fleischproben nachgewiesen werden; SHV-12 war nur in einer einzigen vorhanden.

Bemerkenswert ist, dass in einer Probe (FA-18 in Tabelle 9) drei unterschiedliche ESBL-produzierende *E. coli* Stämme (CTX-M-1, CTX-M-14 und SHV-12) isoliert werden konnten. Eine andere Probe (FA-4 in Tabelle 9) enthielt neben CTX-M-32/TEM-1 auch CTX-M-1 tragende *E. coli* Isolate.

Abbildung 18 ESBL-Gene der 23 unterschiedlichen *E. coli* Stämme, die in 20 Fleischproben gefunden wurden.

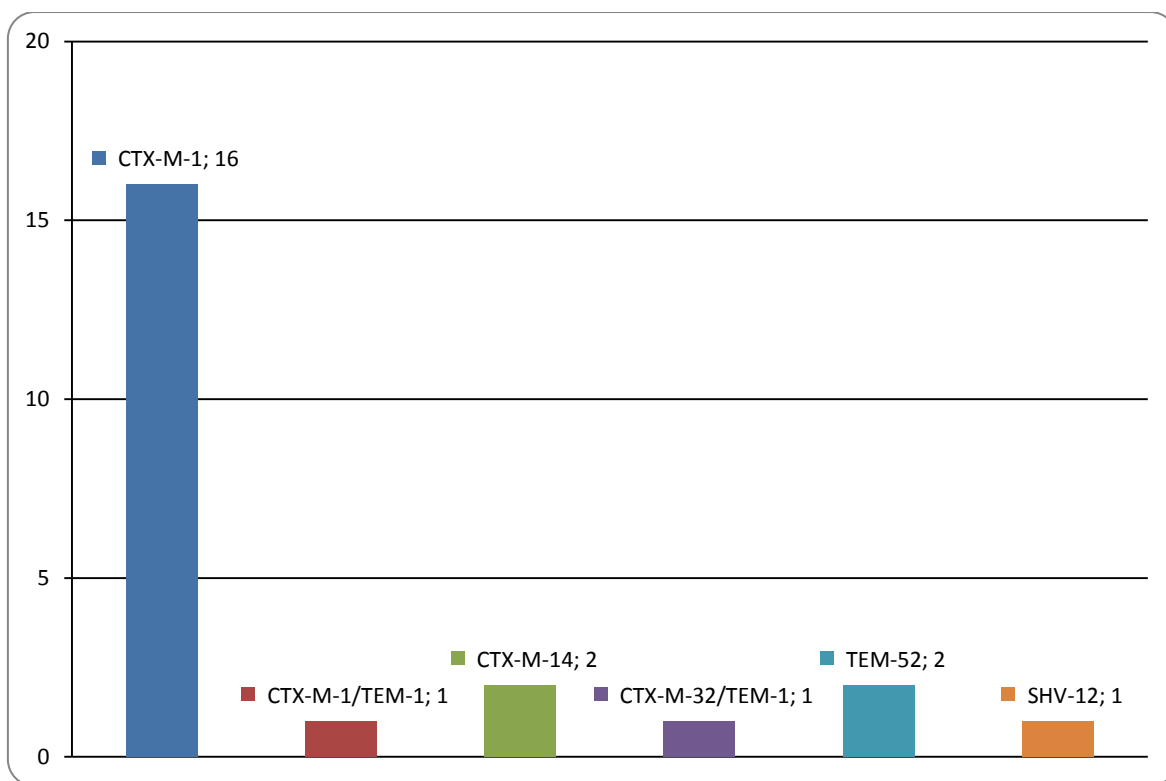
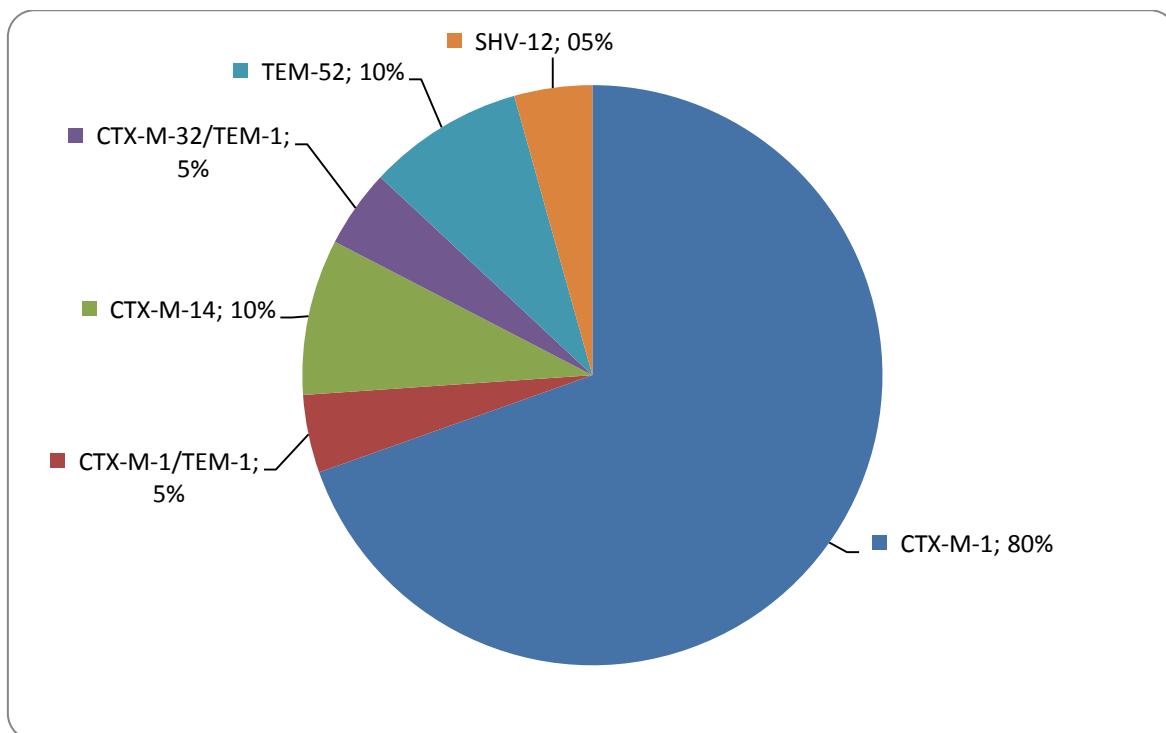


Abbildung 19 Verteilung der ESBL-Gene von *E. coli* in den positiven Proben (n=20).



**Tabelle 10 Vergleich der Resistenzen von ESBL-postiven *E. coli* aus Faschiertem und von ESBL-bildenden *E. coli* aus dem Humanbereich (1). Die p-Werte beziehen sich auf die resistenten (R+) *E. coli*-Stämme**

		ESBL-bildende <i>E. coli</i>					
		Faschiertes (n=38)		Humanbereich (Resistenzbericht 2011)			p-Wert (R+I)
		Anzahl R+I	% R+I	Anzahl R+I	% R+I	n	
<b>Penicilline</b>							
Ampicillin	AM	38	100,0%	427	100,0%	(427)	1
Amoxicillin/Clavulansäure	AMC	1	2,6%	228	53,4%	(427)	<0,01
Piperacillin/Tazobactam	TZP	1	2,6%	55	12,9%	(425)	0,11
<b>Cephalosporine</b>							
Cefuroxim	CXM	38	100,0%	93	98,9%	(94)	1
Cefotaxim	CTX	38	100,0%	423	99,0%	(427)	1
Ceftazidim	CAZ	19	50,0%	320	79,4%	(403)	<0,01
Cefepim	FEP	25	65,8%	257	71,0%	(362)	0,63
<b>Carbapeneme</b>							
Imipenem	IPM	0	0,0%	0	0,0%	(169)	1
Meropenem	MEM	0	0,0%	0	0,0%	(378)	1
<b>Aminoglykoside</b>							
Gentamicin	GM	4	10,5%	206	48,4%	(425)	<0,01
Amikacin	AN	0	0,0%	3	1,8%	(170)	0,94
<b>Fluorchinolone</b>							
Ciprofloxacin	CIP	2	5,3%	327	76,6%	(427)	<0,01
Moxifloxacin	MXF	5	13,2%	49	69,0%	(71)	<0,01
<b>sonstige</b>							
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol (Cotrimoxazol)	SXT	8	21,1%	319	74,7%	(427)	<0,01

Im direkten Vergleich der ESBL-bildenden *E. coli*-Stämme, die aus dem Faschierten (Fa.) isoliert wurden, mit jenem aus dem Humanbereich (Hu.), findet man ähnliche hohe Resistenzraten gegen Ampicillin (Fa.: 100%; Hu.: 100%), Cefuroxim (Fa.: 100%; Hu.: 98,9%) Cefotaxim (Fa.: 100%; Hu.: 99%). Im Humanbereich zeigen jedoch deutlich mehr Isolate Resistenzen gegen Amoxicillin/Clavulansäure (Fa.: 2,6%; Hu.: 12,9%), Ceftazidim (Fa.: 50%; Hu.: 79,4%), Cefepim (Fa.: 65,8%; Hu.: 71%), Gentamicin (Fa.: 10,5%; Hu.: 48,4%), Ciprofloxacin (Fa.: 5,3%; Hu.: 76,6 %), Moxifloxacin (Fa.: 13,2%; Hu.: 69,0%) und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (Fa.: 21,1%; Hu.: 74,7%).

Statistisch signifikante Unterschiede im Resistenzverhalten findet man bei Amoxicillin/Clavulansäure, Ceftazidim, Gentamicin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol.

### 6.1.3 *Acinetobacter* spp

Am dritthäufigsten wurden *Acinetobacter* spp Stämme (n=61) isoliert. Davon war der Großteil von der Art *Acinetobacter baumannii* (n=52). Die restlichen *Acinetobacter* spp (n=9) wurden nicht näher differenziert.

*Acinetobacter baumannii* besitzt intrinsische Resistenzen gegen Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Cefazolin, Cefotaxim, Ceftriaxon, Ertapenem Trimethoprim und Fosfomycin (68). Insbesondere bei den Penicillinen sind die vorhandenen Daten nicht ausreichend um eine evidenzbasierte Wirkung dieser Antibiotikagruppe bei *Acinetobacter* spp zu garantieren. Nach EUCAST sind Gentamicin, Amikacin, Ciprofloxacin, Imipenem und Meropenem wirkungsvolle Antibiotika gegen *Acinetobacter* spp (71). Keiner der 61 getesteten Stämme war gegen die genannten Substanzen resistent.

**Tabelle 11 Anzahl und Resistenzraten der *Acinetobacter* spp, S=sensibel, I= intermediär resistent, R= resistent**

		<b><i>Acinetobacter</i> spp (n=61)</b>				
		Anzahl S	Anzahl I	Anzahl R	Anzahl R+I	% R+I
<b><i>Carbapeneme</i></b>						
Imipenem	IPM	61	0	0	0	0%
Meropenem	MEM	61	0	0	0	0%
<b><i>Aminoglykoside</i></b>						
Gentamicin	GM	61	0	0	0	0%
Amikacin	AN	61	0	0	0	0%
<b><i>Fluorchinolone</i></b>						
Ciprofloxacin	CIP	61	0	0	0	0%

## 6.2 MRSA

In 10 der 100 Proben aus faschiertem Fleisch wurden mittels PCR und Sequenzierung MRSA-Stämme nachgewiesen. In einer Probe wurden sogar zwei MRSA-Isolate mit unterschiedlichen *spa*-Typen gefunden (Tabelle 12).

Abbildung 20 Detektierte *spa*-Typen von MRSA und deren Verteilung, blauer Balken = LA-MRSA, roter Balken=CA-MRSA

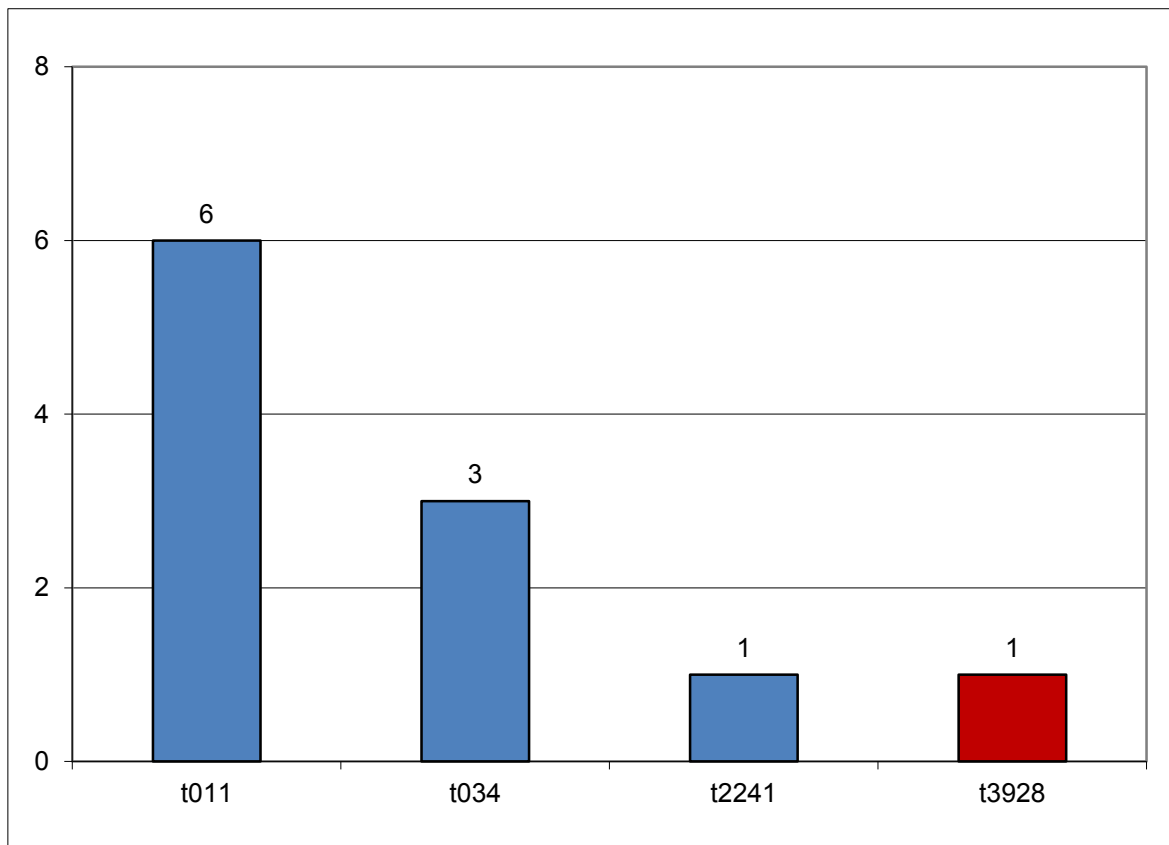


Tabelle 12 Aufschlüsselung der Proben mit MRSA

Positive Proben MRSA	t011	t034	t3928	t2241
FA-MRSA-1		x		
FA-MRSA-2	x			
FA-MRSA-3	x			
FA-MRSA-4	x			
FA-MRSA-5		x		
FA-MRSA-6	x			x
FA-MRSA-7	x			
FA-MRSA-8	x			
FA-MRSA-9			x	
FA-MRSA-10		x		
10 Proben	6	3	1	1

Es wurden zehn LA-MRSA und ein CA-MRSA gefunden. Sechs der zehn LA-MRSA waren vom *spa*-Typ t011, drei t034 und ein t2241. Der CA-MRSA-Stamm trug den *spa*-Typ t3928. Alle LA-MRSA waren gegen Tetracyclin resistent.

**Tabelle 13 Resistenzmuster der detektierten MRSA inklusive *spa*-Typ**

	P	FOX	TE	E	CC	NOR	GM	SXT	FA	RA	LZD	MUP	<i>spa</i> -Typ
FA-MRSA-1													t034
FA-MRSA-2	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	t011
FA-MRSA-3	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S	t011
FA-MRSA-4	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	t011
FA-MRSA-5	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	t034
FA-MRSA-6a	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	t011
FA-MRSA-6b	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	t2241
FA-MRSA-7	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	t011
FA-MRSA-8	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	t011
FA-MRSA-9	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	t3928
FA-MRSA-10	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	t034

Der MRSA-Stamm FA-MRSA-1 ging leider während der Arbeiten am Projekt verloren. Versuche den Stamm aus der tiefgekühlten Nativprobe zu isolieren blieben erfolglos. Somit konnten später auch keine Resistenztestungen am genannten Stamm durchgeführt werden.

### 6.3 Vergleich Supermärkte – Fleischer

Die Fleischproben wurden ihrer Herkunft nach in Proben aus Supermärkten (n=70) bzw. Fleischereien (n=30) geordnet und bezüglich des Vorkommens von ESBL-bildenden *E. coli* und MRSA miteinander verglichen (Tabelle 14). In 16 (22,9%) Supermarkt-Proben und in 4 (13,3%) Proben von Fleischern fanden sich ESBL-bildende *E. coli*. MRSA-Isolate konnten in 9 (12,9%) Supermarkt-Proben und in einer (3,3%) Probe, welche von einem Fleischereibetrieb stammte, detektiert werden. Der Unterschied zwischen Supermärkten und Fleischern in Bezug auf positiv gescreente Proben war statistisch nicht signifikant. Die MRSA-positive Probe vom Fleischer war jedoch mit CA-MRSA (t3928) belastet. Bei Fleischproben aus Supermärkten wurde ausschließlich LA-MRSA gefunden.

**Tabelle 14 Vergleich von Supermärkten und Fleischereien in Bezug auf jene Proben, die mit ESBL-bildenden *E. coli* bzw. MRSA belastet waren.**

	Supermärkte (n=70)	Fleischer (n=30)	p-Wert
ESBL- <i>E. coli</i>	16 (22,9%)	4 (13,3%)	0,41
MRSA	9 (12,9%)	1 (3,3%)	0,28

## 7 Diskussion

Antibiotikaresistente Keime haben längst ihren Weg aus Krankenhäusern und anderen Gesundheitseinrichtungen in die Umwelt gefunden. So wurde in einer Studie die Belastung von österreichischen Gewässern mit ESBL-bildenden Keimen untersucht (72). Dabei wurden in fast zwei Drittel der Klärschlammproben ESBL-bildende *E. coli* gefunden. In aktuellen Untersuchungen wurde auch bestätigt, dass diese Keime auf genetischer Ebene (73) und im Resistenzverhalten (74) mit Bakterienisolaten aus dem humanmedizinischen Bereich übereinstimmen. Der vorherrschende Genotyp bei den *E. coli*-Isolaten aus den Umwelt- und Humanproben war CTX-M-15. Am zweithäufigsten wurde in beiden Untersuchungsmaterialien CTX-M-1 gefunden, jedoch mit einer deutlich niedrigeren Prävalenz in den Humanproben verglichen mit den Umweltproben. Der Autor vermutet, dass möglicherweise ein tierischer Eintrag von CTX-M-1, diese Verteilung erklären könnte (73). Diese Behauptung konnte in der vorliegenden Studie bekräftigt werden: In 17 der 20 (85%) ESBL-positiven Proben waren CTX-M-1 bzw. CTX-M-1/TEM-1, während kein einziger Stamm CTX-M-15 exprimiert. Zu widersprüchlichen Ergebnissen kommt eine Studie aus der Steiermark, die Fleischproben (Huhn, Rind, Schwein) und Humanproben (Stuhl und Harn) auf ESBL-bildenden *E. coli* untersuchte. (75). Es wurden zwar reichlich ESBL-produzierende *E. coli* in den Hühnerproben (vorwiegend CTX-M-1), aber kaum in den Fleischproben von Rindern und Schweinen gefunden. Außerdem wurden auch keine ESBL-Gene aus den Gruppen SHV oder TEM gefunden.

Andere Studien wiederum bekräftigen, dass tierische Nahrungsmittel als Reservoir von antibiotikaresistenten Keimen eine Rolle spielen (76-79). Niederländische Forscher konnten die genotypische Verwandtschaft von ESBL-bildenden *E. coli*, die aus Hühnerfleischproben isoliert wurden, mit ESBL-bildenden *E. coli* von hospitalisierten Patienten erbringen (79). Der vorherrschende Genotyp in den Tierproben (ca. 58%) und in humanen Stuhlproben (ca. 46%) war CTX-M-1. In den Blutkulturen war CTX-M-1 mit ca. 21% am zweithäufigsten nach CTX-M-14 (ca. 33%) vertreten. In der vorliegenden Untersuchung war CTX-M-1 mit 85% zwar häufiger vorhanden, dies könnte aber auf unterschiedliche Prävalenzen von ESBL Genen von *E. coli* in Hühnern und Schweinen bzw. Rindern oder auf geographische Unterschiede in der Verteilung von ESBL-Genen in *E. coli*

zurückzuführen sein. Es wurden aber auch widersprüchliche Ergebnisse aus der Schweiz veröffentlicht (77). Dort fand man in keiner einzigen Probe aus gemischtem Faschierten ESBL-bildende *E. coli*. Eine Erklärung der Ergebnisse könnte die heterogene Zusammensetzung der untersuchten Proben liefern (55 Rind, 15 Schwein, 9 Rind/Schwein, 3 Rind/Kalb/Schwein, 2 Lamm, 2 Rind/Lamm, 15 unbekannter Ursprung). Der hohe Anteil an faschiertem Rind könnte ebenfalls die gegensätzlichen Resultate erklären. In Österreich weisen *E. coli* von Rindern insgesamt weniger Antibiotikaresistenzen auf als jene, die von Schweinen stammen (43).

Der Inlandsverbrauch an Fleischprodukten betrug 2011 in Österreich 831,8 Tonnen (Statistik Austria „Versorgungsbilanzen“; <http://www.statistik.at>, last accession January 2013). Der Durchschnittsverbrauch lag bei 98,8 kg pro Kopf, wovon 55,6 kg (56%) vom Schwein, 17,8 kg (18%) von Rindern bzw. Kälbern, 20,8 kg (21%) von Geflügelprodukten und der Rest von anderen Quellen (Schaf und Ziege, Pferd, Innereien) stammte. In der vorliegenden Arbeit wurde gemischtes, faschiertes Fleisch als repräsentatives Fleischerzeugnis für Fleischprodukte aus Schwein und Rind gewählt, die 2011 zusammen mehr als drei Viertel (77%) des jährlichen pro Kopf Verbrauchs an Fleischprodukten der österreichischen EinwohnerInnen ausmachten. Da es sich um Mischproben handelt, ist es schwer Rückschlüsse auf die Herkunft der isolierten *E. coli* zu führen. Es ist aber zu vermuten, dass der überwiegende Anteil der gefundenen ESBL-bildenden *E. coli* vom Schwein stammen dürfte.

Die ESBL-Genfamilie CTX-M wurde am häufigsten im faschierten Fleisch detektiert. CTX-M-1 und CTX-M-32 gehören dem CTX-M-1 Cluster an, CTX-M-14 dem CTX-M-8 Cluster (38,40). Das häufigste ESBL Gen im faschierten Fleisch war CTX-M-1 (17/20; 85%), gefolgt von CTX-M-14 (2/20; 10%) und TEM-52 (2/20; 10%). Bei Infektionen beim Menschen wurde v.a. CTX-M-15, aber auch CTX-M-1 gefunden (73). Ein Teil der Infektionen beim Menschen könnte somit durch den Eintrag von CTX-M-1 exprimierenden *E. coli* durch tierische Lebensmittel erklärt werden. Unklar bleibt der Ursprung CTX-M-15 tragender *E. coli*. Dieses ESBL-Gen wurde in dieser Studie kein einziges Mal detektiert.

Geht man davon aus, dass faschiertes Fleisch eine Bedeutung als Eintragsquelle von ESBL-bildenden *E. coli* in das Gesundheitswesen hat, könnte man die abweichenden Resistenzen der Isolate aus dem Humanbereich (Tabelle 10) durch den Einsatz verschiedener Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin erklären. Im Jahresvergleich zwischen 1998 und 2007 ist der Antibiotikaverbrauch im Gesundheitswesen in Österreich zwar konstant geblieben, jedoch haben sich die Verordnungen auf andere Antibiotikaklassen hin verschoben (80). Der größere Einsatz von Fluorchinolonen und  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wäre eine Erklärung für die höheren Resistenzraten der ESBL-*E. coli*-Stämme aus dem Humanbereich gegen Amoxicillin/Clavulansäure, Ceftazidim, Cefepim, Ciprofloxacin und Moxifloxacin. In Österreich wurden im Jahr 2010 von Pharmagroßhändlern 62,83 Tonnen abgesetzt. 57,6% (34,9 t) der systemisch verabreichten Antibiotika waren Tetracycline (43).

Es könnten aber auch durch Übertragung via horizontalen Gentransfer von anderen Bakterienarten auf *E. coli* Resistenzen erworben werden. Hier könnten v.a. im Darm vorkommende Enterobacteriaceae eine bedeutende Rolle spielen.

Ein weiterer Grund für die höheren Resistenzraten gegen Amoxicillin/Clavulansäure im Humanbereich (36,1%) im Gegensatz zum Faschierten (2,6%) könnte das häufigere Auftreten von TEM-1 tragenden *E. coli* im Humanbereich sein. Dieses ESBL-Gen hat phänotypisch häufiger eine Resistenz gegen Amoxicillin/Clavulansäure zur Folge. Die hohen Resistenzraten der *E. coli* Stämme aus dem Humanbereich gegen Ciprofloxacin (Fa.: 5,3%; Hu.:75,2 %,  $p < 0,01$ ) könnten auf ähnliche Weise erklärt werden. Es scheint, dass CTX-M-1 und CTX-M-14 tragende *E. coli* eher sensibel auf Ciprofloxacin sind, während CTX-M-15-exprimierende Stämme resistent sind. CTX-M-15 wurde ausschließlich bei Humanproben gefunden und konnte in keiner einzigen Probe aus faschiertem Fleisch gefunden werden. Gleiche Ergebnisse findet man auch in der Schweiz, wo der überwiegende CTX-M-Typ bei Tieren CTX-M-1 und beim Menschen CTX-M-15 ist (77).

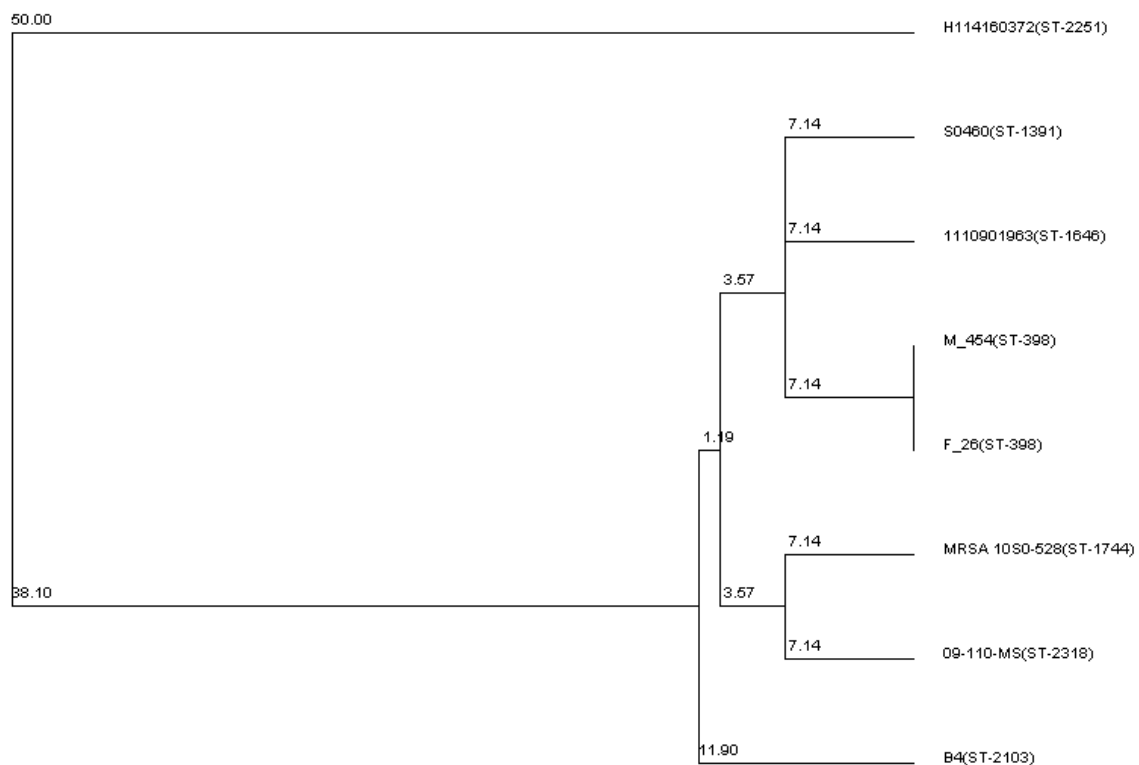
Der hohe Anteil an isolierten *Serratia* spp. ist durch die ähnliche phänotypische Erscheinung der Bakterienkolonien auf dem chromeID<sup>TM</sup> ESBL Agar mit *E. coli*-Kolonien zu erklären. Trotz der geringen Bedeutung von *Serratia* spp in der Humanmedizin wurden Resistenztestungen durchgeführt, um eine mögliche

Übertragung von Resistenzgenen auf humanpathogene Bakterienarten zu erfassen. Obwohl *Serratia fonticola* gegen die meisten Penicilline und Cephalosporine primär resistent ist (70), gab es einige Stämme die *in vitro* sensibel gegen Ampicillin und Cefalexin waren. Ob sich diese Antibiotika dann aber auch *in vivo* bei Infektionen am Menschen als wirksam erweisen, bleibt fraglich. Weitere Untersuchungen müssten durchgeführt werden, um intrinsische Resistenzen von *Serratia fonticola* gegen Ampicillin und Cefalexin zu erfassen.

Die isolierten *Acinetobacter* spp waren im Resistenzverhalten unauffällig. Kein einziger der getesteten Stämme (n=61) war gegen die empfohlenen Antibiotika (Aminoglykoside, Fluorchinolone und Carbapeneme) resistent. Die Vermutung liegt nahe, dass *Acinetobacter* spp als ubiquitär vorkommender Keim ein Hinweis auf die Verunreinigung von faschiertem Fleisch darstellen könnte. Das gramnegative Bakterium kommt sowohl im Boden, als auch im Trinkwasser vor und überlebt sogar auf trockenen Oberflächen.

Ein weiterer interessanter Fund in den Fleischproben waren die elf MRSA-Isolate. Es wurden zehn LA-MRSA und ein CA-MRSA gefunden. Die LA-MRSA waren vom *spa*-Typ t011, t034 und t2241. Der *spa*-Typ t011 wurde in der Schweiz bei einem MRSA mit dem Sequenztyp ST398 gefunden (<http://saureus.mlst.net>; last accession January 2013), der die Fähigkeit besitzt den Menschen zu kolonisieren und zu Infektionen führen kann (81). Da in dieser Studie die MRSA-Isolate nicht durch MLST weiter differenziert wurden, ist die Aussage, dass der gefundene *spa*-Typ t011 vom Sequenztyp ST398 ist, nur spekulativ. Der MRSA mit dem *spa*-Typ t011 wurde auch bei anderen Sequenztypen gefunden (ST1391 und ST1646 in den Niederlanden, ST1744 in Deutschland, ST2103 in Spanien, ST2251 in England und ST2318 in Ungarn). Deren phylogenetische Verwandtschaft der genannten Sequenztypen ist in Abbildung 21 in einem Dendrogramm dargestellt.

Abbildung 21 Phylogenetischer Stammbaum von verschiedenen LA-MRSA mit dem *spa*-Typ t011 aus verschiedenen Ländern © <http://saureus.mlst.net>



Im Gegensatz dazu ist t034 mit einem MRSA vom Sequenztyp ST398 aus der Schweiz assoziiert (<http://saureus.mlst.net>; last accession 01/13). In einer Studie aus Deutschland wurden MRSA mit den *spa* Typen t011 und t034 aus Nasenabstrichen von Schweinen isoliert. Alle waren mit dem Sequenztyp ST398 assoziiert (82). Aus dieser Studie könnte man ableiten, dass die gefundenen MRSA mit den *spa* Typen t011 und t034 vom Schwein stammen. Eine Untersuchung aus den Niederlanden konnte jedoch MRSA-Stämme mit dem Sequenztyp ST398 auch aus Kuhmilchproben isolieren.

Eine Studie aus Frankreich untersuchte *S. aureus* Isolate aus Blutkulturen (83). Obwohl alle den Sequenztyp ST398 hatten, war kein einziges Isolat mit dem *spa* Typ t011 oder t034 assoziiert. Der Autor vermutet, dass wegen des fehlenden Bezugs der PatientInnen zur Nutztierhaltung, ein horizontaler Gentransfer stattgefunden haben könnte; möglicherweise über die Nahrungskette. Dies würde die Vermutung stützen, dass tierische Nahrungsmittel einen Beitrag zur Verbreitung von Resistenzen leisten.

Die Häufigkeiten von MRSA in Fleischprodukten wurde in anderen Studien bestätigt. Eine Studie aus den USA, die 395 Proben aus Schweineprodukten auf

das Vorkommen von *S. aureus* untersuchte, fand in 6,6% (n=26) MRSA positive Proben. 26,9% der MRSA waren mit dem Sequenztyp ST398 (t011, t034) assoziiert (84). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dieser Studie bei der in zehn von 100 Fleischproben (10%; 95% CI 5,2%–18%) MRSA gefunden wurde. In Deutschland wurden 2009 Lebensmittel aus dem Einzelhandel auf das Vorkommen von MRSA untersucht. In 12,9% der Kalb- und in 15,8% der Schweinefleischproben (24,3% im Hackfleisch) wurden MRSA gefunden. Bei der genetischen Typisierung überwogen wieder die beiden *spa* Typen t011 und t034 aus dem klonalen Komplexe CC398 (85).

Alle LA-MRSA waren gegen Tetracyclin resistent, ein Antibiotikum, das früher in der Tierzucht als Wachstumsförderer eingesetzt wurde. Seit 1. Januar 2006 ist es in der Europäischen Gemeinschaft auf Grund der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 verboten, Antibiotika in der Nutztierhaltung als Futtermittelzusatzstoffe bzw. Leistungsförderer zu verwenden. Trotzdem dürfen Tetracycline von Veterinärmedizinern bei Gefährdung der Tiergesundheit weiterhin eingesetzt werden. Dies wäre eine Erklärung für die hohen Resistenzraten der LA-MRSA gegen Tetracyclin. Ein gefürchtetes Ereignis ist der Austausch von Resistenzgenen zwischen einem LA-MRSA und CA-MRSA Stamm, weil auf diese Weise ein MRSA mit Eigenschaften von CA-MRSA (PVL) und LA-MRSA (Tetracyclinresistenz) entstehen könnte.

Eine Fleischprobe wurde positiv auf einen CA-MRSA-Stamm (*spa*-Typ t3928) getestet. CA-MRSA kommt in Europa weniger häufig vor als HA-MRSA, ist aber in der Prävalenz ansteigend (81). Obwohl der Name vermuten lässt, dass CA-MRSA nur in der Allgemeinbevölkerung Krankheiten verursacht, gewinnt er immer mehr als nosokomialer Keim an Bedeutung. Da CA-MRSA vorwiegend beim Menschen vorkommt, könnte auch eine menschliche Kontamination von tierischen Lebensmitteln durch MRSA-Träger in fleischverarbeitenden Betrieben eine Rolle spielen.

Bei den Proben mit ESBL-bildenden *E. coli* und MRSA konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Supermärkten bzw. Fleischern entdeckt werden. Auffallend ist jedoch, dass die positive CA-MRSA-Probe von einem

Fleischereibetrieb stammt. Alle anderen LA-MRSA Isolate wurden in Supermarkt-Proben nachgewiesen.

Die Vermutung liegt nahe, dass Fleischproben aus Supermärkten vom Nutztier kontaminiert werden. Umgekehrt könnte eine Verunreinigung von Proben aus Fleischereibetrieben mit CA-MRSA durch menschlichen Eintrag verursacht werden.

### **7.1 Schlussfolgerung**

In anderen Untersuchungen wurden bei *E. coli*-Isolaten aus humanen Proben (Stuhl, Harn, Blut) dieselben ESBL-Gene gefunden, wie in dieser Studie; allen voran CTX-M-1. Ebenso wurden LA-MRSA mit den *spa*-Typen t011 und t034 isoliert, bei denen eine mögliche Assoziation zum Sequenztyp ST398 besteht, der Menschen kolonisieren und infizieren kann. Eine teilweise Beteiligung von resistenten Keimen aus tierischen Lebensmitteln an der Kolonisation und Infektion von Menschen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Inwieweit eine Gefahr für Konsumenten von tierischen Nahrungsmitteln ausgeht, kann jedoch nur schwer abgeschätzt werden. Deshalb müssten weitere Studien auch andere mögliche Eintragsquellen von ESBL-bildenden Keimen und MRSA in das Gesundheitswesen untersuchen. Eine Überprüfung der an Krankenanstalten angelieferten Nahrungsmittel und zubereiteten Speisen oder aus Hochrisikoländern importierte Lebensmittel auf resistente Keime würde wertvolle Informationen zu den Ursprüngen und der Verbreitung von resistenten Bakterien liefern.

## 8 Literaturverzeichnis

- (1) Feierl G, Buzina W, Masoud-Landgraf L. Resistenzbericht 2011, Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin, Medizinische Universität Graz, Labor für medizinische Bakteriologie und Mykologie. 2012.
- (2) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty First International Supplement. ; 2011.
- (3) Buke C, Armand-Lefevre L, Lolom I, Guerinot W, Deblangy C, Ruimy R, et al. Epidemiology of multidrug-resistant bacteria in patients with long hospital stays. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007 Nov;28(11):1255-1260.
- (4) Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes *Clin Infect Dis* 2001 Apr 15;32(8):1162-1171.
- (5) World Health Organization (WHO). The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals. Report of a WHO Meeting. Berlin, Germany, 13-17 October 1997. Available at: <http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO EMC ZOO 97.4.pdf>. Accessed 11/21/2012, 2012.
- (6) Porstner H. Antibiotikaresistente Keime in österreichischem Hühnerfleisch. März 2012; Available at: [http://www.global2000.at/module/media/data/global2000.at\\_de/content/gentechnik-dokumente/Huhn\\_HG\\_03.pdf](http://www.global2000.at/module/media/data/global2000.at_de/content/gentechnik-dokumente/Huhn_HG_03.pdf). Accessed 8/29/2012, 2012.
- (7) Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES). Antibiotika in der Nutztierhaltung und mögliche Konsequenzen. Available at: <http://www.ages.at/ages/gesundheit/mensch/antibiotikaresistenzen/antibiotika-in-der-nutztierhaltung-und-moegliche-konsequenzen/>. Accessed 6/27/2012, 2012.
- (8) Hinzpeter W. Gefährliche Bakterien im Schweinefleisch: Eine Riesensauerei! 2012; Available at: <http://www.stern.de/ernaehrung/gefaehrliche-bakterien-im-schweinefleisch-eine-riesensauerei-1783555.html>. Accessed 17/01/2013.
- (9) Bundesministerium für Gesundheit (BMG) editor. AURES 2010 - Resistenzbericht Österreich - AGES. 1.th ed.: Bundesministerium für Gesundheit (BMG); 2011.
- (10) Martinez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002 Oct;15(4):647-679.
- (11) Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance *Cell* 2007 Mar 23;128(6):1037-1050.

- (12) Giedraitiene A, Vitkauskiene A, Naginiene R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria *Medicina (Kaunas)* 2011;47(3):137-146.
- (13) Hof H, Dörries R. *Medizinische Mikrobiologie* 3.th ed.: Georg Thieme Verlag; 2005.
- (14) Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines *J Bacteriol* 2002 Jun;184(11):3017-3026.
- (15) Martinez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance *Clin Microbiol Rev* 2002 Oct;15(4):647-679.
- (16) Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance *BMJ* 1998 Sep 5;317(7159):657-660.
- (17) Witte W, Milke M.  $\beta$ -Laktamasen mit breitem Wirkspektrum: Grundlagen, Epidemiologie und Schlussfolgerungen für die Prävention. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 2003 2003(46):881-890.
- (18) Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance *Clin Microbiol Rev* 1995 Oct;8(4):557-584.
- (19) Jacoby GA. Beta-lactamase nomenclature *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Apr;50(4):1123-1129.
- (20) Jaurin B, Grundstrom T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Aug;78(8):4897-4901.
- (21) Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Nov;84(21):7378-7382.
- (22) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Jun;39(6):1211-1233.
- (23) Polotto M, Casella T, Lucca MG, Rubio F, Nogueira M, Almeida M, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla* *BMC Infectious Diseases* 2012 08-03:176.
- (24) Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms *Clin Microbiol Rev* 2009 Oct;22(4):582-610.
- (25) Dent LL, Marshall DR, Pratap S, Hulette RB. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a descriptive study in a city hospital *BMC Infect Dis* 2010 Jul 7;10:196.

- (26) Fishbain J, Peleg AY. Treatment of Acinetobacter infections Clin Infect Dis 2010 Jul 1;51(1):79-84.
- (27) Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-Resistant Acinetobacter spp.: Increasingly Problematic Nosocomial Pathogens. Yonsei Med J 2011;52(6):879.
- (28) Neumeister N, Braun R, Kimmig P. Mikrobiologische Diagnostik. 2009.
- (29) Der Spiegel. Ein Bakterium versetzt Deutschland in Angst 2011; Available at: <http://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/wissenschaft-2011-ein-bakterium-versetzt-deutschland-in-angst-a-806124.html#ref=rss;>. Accessed 02/09/2013.
- (30) Der Spiegel. Bockshornklee-Samen als Ehec-Verursacher bestätigt 2011; Available at: <http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/epidemie-bockshornklee-samen-als-ehec-verursacher-bestaetigt-a-800671.html#ref=rss;>. Accessed 02/09/2013.
- (31) Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors Clin Microbiol Rev 1998 Oct;11(4):589-603.
- (32) Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria Lancet Infect Dis 2009 Apr;9(4):228-236.
- (33) Rote-Hand-Brief zur Einschränkung aller Anwendungsgebiete von Tygacil® (Tigecyclin) aufgrund erhöhter Mortalität in klinischen Studien. Available at: <http://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/DSM/Archiv/2011-148.html>. Accessed 8/17/2012, 2012.
- (34) Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update Clin Microbiol Rev 2005 Oct;18(4):657-686.
- (35) Payne DJ, Marriott MS, Amyes SG. Characterisation of a unique ceftazidime-hydrolysing beta-lactamase, TEM-E2 J Med Microbiol 1990 Jun;32(2):131-134.
- (36) Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli Infection 1990 Sep-Oct;18(5):294-298.
- (37) Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from Escherichia coli that inactivates oxyimino-cephalosporins Antimicrob Agents Chemother 1988 Aug;32(8):1243-1246.
- (38) Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes Antimicrob Agents Chemother 2004 Jan;48(1):1-14.
- (39) Poirel L, Kampfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of Kluyvera georgiana, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases Antimicrob Agents Chemother 2002 Dec;46(12):4038-4040.

- (40) Canton R, Gonzalez-Alba JM, Galan JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion *Front Microbiol* 2012;3:110.
- (41) Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jan;46(1):1-11.
- (42) analyse BioLab GmbH; Nationales Referenzzentrum für nosokomiale Infektionen und Antibiotikaresistenz. Carbapenemase Available at: <http://www.analyse.eu/nationales-referenzzentrum/carbapenemase.html>. Accessed 9/16/2012, 2012.
- (43) Bundesministerium für Gesundheit (BMG) editor. AURES 2011 - Resistenzbericht Österreich. 1.th ed.: Bundesministerium für Gesundheit (BMG); 2012.
- (44) European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). EARS-Net Database Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/database.aspx>. Accessed 9/30/2012, 2012.
- (45) Medizinische Universität Wien, Klinisches Institut für Krankenhaushygiene. Hygienerichtlinie Extended spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Bildner Version 04 AKH-KHH-RL-030. 2010.
- (46) Institut für Krankenhaushygiene und Mikrobiologie (IKM) KAGES. Fachrichtlinie Nr. 27 - Hygienemaßnahmen bei Nachweis von multiresistenten gramnegativen Bakterien /Version 2.0. 2012.
- (47) Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks *Clin Microbiol Rev* 1997 Jul;10(3):505-520.
- (48) Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002 *J Infect Dis* 2006 Jan 15;193(2):172-179.
- (49) Medizinische Universität Wien, Klinisches Institut für Krankenhaushygiene. Hygienerichtlinie MRSA Version 02 AKH-KHH-RL-008. 2012.
- (50) David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic *Clin Microbiol Rev* 2010 Jul;23(3):616-687.
- (51) Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation *J Clin Microbiol* 2004 Feb;42(2):792-799.
- (52) Apfalter P. MRSA/MRSE - VISA/GISA/VRSA - PRP -VRE: Aktuelle gram-positive Problemkeime und ihre Resistenzmechanismen, Prävalenz und klinische Konsequenz. *WMW* 2003 7/8/2003(153):144-147.

- (53) Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) *Curr Opin Microbiol* 2012;15(5):588-595.
- (54) Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009 *Euro Surveill* 2010 Apr 22;15(16):19542.
- (55) Fitzgerald JR. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat *Trends Microbiol* 2012 Apr;20(4):192-198.
- (56) Loeffler A, Lloyd DH. Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? *Epidemiol Infect* 2010 May;138(5):595-605.
- (57) Borde JP, Kern WV. Treatment of MRSA infections *Dtsch Med Wochenschr* 2012 Nov 9.
- (58) Aqil F, Khan MS, Owais M, Ahmad I. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta-lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* *J Basic Microbiol* 2005;45(2):106-114.
- (59) Institut für Krankenhaushygiene und Mikrobiologie (IKM) KAGES. Fachrichtlinie Nr. 11 - MRSA /Version 3.0. 2012.
- (60) Oxoid. Oxoid Handbuch. 6.th ed. Wesel, Germany; 2003.
- (61) bioMérieux SA. chromID™ ESBL Agar Gebrauchsanleitung REF 43481. 2010.
- (62) Busch U editor. Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik. : Springer-Verlag; 2010.
- (63) bioMérieux SA. chromID™ TSA Agar Gebrauchsanleitung REF 43011/43019. 2010.
- (64) bioMérieux SA. chromID™ CNA Agar Gebrauchsanleitung REF 43071/43079. 2010.
- (65) S. Schubert AW. Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik. *J Lab Med* 2011(35):195-203.
- (66) Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory *Clin Biochem* 2011 Jan;44(1):104-109.
- (67) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing Version 2.1 - Slide Show. Eucast 2012 Feb.

- (68) Leclercq R, Canton R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing *Clinical Microbiology and Infection* 2011 11-25;18(8):no-no.
- (69) Kunz B editor. *Grundriss der Lebensmittel-Mikrobiologie*. 1.th ed. Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co; 1988.
- (70) Stock I, Burak S, Sherwood KJ, Gruger T, Wiedemann B. Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea* *J Antimicrob Chemother* 2003 Apr;51(4):865-885.
- (71) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0. Eucast 2013 Fri, 21 Dec.
- (72) Reinthaler FF, Feierl G, Galler H, Haas D, Leitner E, Mascher F, et al. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge *Water Res* 2010 Mar;44(6):1981-1985.
- (73) Zarfel G, Galler H, Feierl G, Haas D, Kittinger C, Leitner E, et al. Comparison of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. *Environ Pollut* 2013 Feb(173):192-199.
- (74) Reinthaler F, Galler H, Feierl G, Haas D, Leitner E, Mascher F, et al. Resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from sewage sludge in comparison with those isolated from human patients in 2000 and 2009. *J Water Health* 2012(12/10/2012 In Press; Uncorrected Proof).
- (75) Springer B, Bruckner K. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* from raw meat and comparison to human isolates. *Wien Tierarztl Monatsschr* 2012(99):44-50.
- (76) Weese JS, Reid-Smith R, Rousseau J, Avery B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) contamination of retail pork. *Can Vet J* 2010 Jul;51(7):749-752.
- (77) Geser N, Stephan R, Hachler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk *BMC Vet Res* 2012 Mar 7;8:21.
- (78) Schwaiger K, Huther S, Holzel C, Kampf P, Bauer J. Prevalence of antibiotic-resistant *enterobacteriaceae* isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany *Int J Food Microbiol* 2012 Mar 15;154(3):206-211.
- (79) Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, et al. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011 Jul;17(7):1216-1222.

- (80) Metz-Gercek S, Maieron A, Strauß R, Wieninger P, Apfalter P, Mittermayer H. Ten years of antibiotic consumption in ambulatory care: Trends in prescribing practice and antibiotic resistance in Austria BMC Infectious Diseases 2009;9(1):61.
- (81) Kock R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe Euro Surveill 2010 Oct 14;15(41):19688.
- (82) Köck R, Harlizius J, Bressan N, Laerberg R, Wieler LH, Witte W, et al. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2009;28(11):1375-1382.
- (83) Valentin-Domelier A, (RHC),for the Bloodstream Infection Study Group of the Réseau des Hygiénistes du Centre. Methicillin-Susceptible ST398 Staphylococcus aureus Responsible for Bloodstream Infections: An Emerging Human-Adapted Subclone? ONE Alerts 2011 12-05.
- (84) O'Brien AM, Hanson BM, Farina SA, Wu JY, Simmering JE, Wardyn SE, et al. MRSA in conventional and alternative retail pork products PLoS One 2012;7(1):e30092.
- (85) Bundesinstitut für Risikobewertung. Zoonosen in Deutschland 2009. Available at: [http://www.bfr.bund.de/cm/350/erreger\\_von\\_zoonosen\\_in\\_deutschland\\_im\\_jahr\\_2009.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/350/erreger_von_zoonosen_in_deutschland_im_jahr_2009.pdf). Accessed 1/13/2013, 2013.