



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Prävalenz von Methicillin-resistenten Staphylokokken,
extended-spectrum- β -Laktamase-bildenden
Enterobakterien und Vancomycin-resistenten
Enterokokken in Fleisch

verfasst von

Sofia Viktoria Wanner, Bakk. rer. nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von:

Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. rer. nat. techn. Mohammad Manafi

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Univ. Prof. Dr. Mohammad Manafi für die Bereitstellung des interessanten Themas und die kompetente, zuverlässige und freundliche Betreuung bedanken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern.

Ihr habt mir durch eure Hilfe, Unterstützung und Ermutigung mein Studium ermöglicht.

Meinen Schwestern Julia, Sarah und Viktoria möchte ich für ihre Unterstützung und ihre Ratschläge danken.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
I. Einleitung und Fragestellung	1
II. Literaturüberblick	3
1 Antibiotika und Antibiotikaresistenzen	3
1.1 Definition und Wirkmechanismen	3
1.2 Antibiotikaresistenz von Bakterien	7
1.2.1 Resistenzmechanismen	8
1.2.2 Resistenztransfer	11
1.3 Methoden zur Resistenzbestimmung	13
2 Einsatzbereiche von Antibiotika	18
2.1 Antibiotikaeinsatz in der Humanmedizin	18
2.2 Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin	20
2.3 Antibiotikaeinsatz in Aquakulturen	24
2.4 Antibiotikaeinsatz in der Pflanzenzucht	26
2.4.1 Einsatz als Pflanzenschutzmittel	26
2.4.2 Einsatz als Markergeren bei genetisch modifizierten Pflanzen	27
3 Ausgewählte antibiotikaresistente Bakterien	29
3.1 Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	29
3.2 Extended-spectrum- β -Lactamase (ESBL) bildende Enterobakterien	31
3.3 Vancomycin-resistente Enterokokken VRE	34
4 Antibiotikaresistente Bakterien – gesundheitliche Bedeutung und Risiko für den Menschen	37
4.1 Gesundheitliche Auswirkungen von Antibiotikaresistenzen	37
4.2 Resistenzraten im europäischen Vergleich	42

5	Lebensmittel als Vehikel bei der Übertragung von antibiotikaresistenten Bakterien	46
III.	Material und Methoden	56
1	Proben und Nährmedien	56
2	Bakterielle Isolierung, Identifizierung und antimikrobielle Empfindlichkeitstests	58
IV.	Ergebnisse und Diskussion	59
1	Prävalenz von antibiotikaresistenten Bakterien	60
1.1	Prävalenz von Methicillin-resistenten Staphylokokken MRS	60
1.2	Prävalenz von ESBL-bildenden Enterobakterien	61
1.3	Prävalenz von Vancomycin-resistenten Enterokokken	62
2	Empfindlichkeitstests	63
2.1	Methicillin-resistente Staphylokokken	63
2.2	ESBL-bildende Enterobakterien	64
3	Diskussion	66
V.	Schlussbetrachtung	71
VI.	Zusammenfassung	76
VII.	Summary	79
VIII.	Literaturverzeichnis	83
	Anhang 1: Antibiogramm der Staphylokokken (mm Hemmhof)	97
	Anhang 2: Antibiogramm der Enterobakterien (mm Hemmhof)	99
	Lebenslauf	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkorte von Antibiotika und Resistenzmechanismen [MULVEY und SIMOR, 2009]	11
Abbildung 2: Antibiotika für den therapeutischen Einsatz in Fischfarmen und die produzierte Biomasse in Norwegen, 1981-2009 [WHO, 2011]	25
Abbildung 3: Einsatz von Avoparcin und die Entwicklung der Glykopeptid-Resistenz in Dänemark, 1994-2005 [WHO, 2011]	36
Abbildung 4: MRSA-Raten im internationalen Vergleich 2007 und 2011 [BMG, 2012]	43
Abbildung 5: Aminopenicilline-Resistenzraten von <i>Escherichia coli</i> im europäischen Vergleich 2007 und 2011 [BMG, 2012]	44
Abbildung 6: Vancomycin-resistente <i>Enterococcus faecium</i> im europäischen Vergleich 2005 und 2011 [ECDC, 2005-2013]	45
Abbildung 7: Routen der Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgenen [WITTE, 2000]	47
Abbildung 8: Horizontaler Gentransfer in Lebensmitteln [VERRAES et al., 2013]	53
Abbildung 9: Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> auf chromID MRSA (BioMérieux)	57
Abbildung 10: ESBL-bildende <i>Escherichia coli</i> (links) und ESBL-bildende <i>Klebsiella pneumoniae</i> (rechts) auf chromID ESBL (BioMérieux)	58
Abbildung 11: Probenanzahl und Proben mit antibiotikaresistenten Bakterien nach Fleischsorte	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirkmechanismen von Antibiotika [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012]	4
Tabelle 2: Antibiotikaklassen, Strukturen und Angriffspunkte [mod. nach BONOMO und GILL, 2005]	6
Tabelle 3: Empfindlichkeit von <i>Staphylococcus aureus</i> gegenüber verschiedener Antibiotika [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012]	15
Tabelle 4: Einteilung der in der Humanmedizin verwendeten β -Lactam- Antibiotika [mod. nach WILLE, 2007a]	18
Tabelle 5: Einteilung der Antibiotika in der Humanmedizin [WILLE, 2007a]	19
Tabelle 6: Einteilung der Antibiotika in der Veterinärmedizin [UMWELTBUNDESAMT, 2010]	21
Tabelle 7: Resistenzprofile von Staphylokokken	64
Tabelle 8: Resistenzprofile von Enterobacteriaceae	65

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Entdeckung von antibakteriell wirkenden Substanzen führte zur Entwicklung von Antibiotika zur Behandlung von oft lebensbedrohlichen bakteriellen Infektionen in den 1940er Jahren. Nur wenige Jahre danach entstanden durch die Verwendung dieser Medikamente widerstandsfähige Krankheitserreger. Wenn Antibiotika eingesetzt werden, kommt es zu einem Selektionsdruck und zur Anreicherung resistenter Bakterien, die nicht nur Resistenzen gegen die verwendeten Medikamente sondern auch gegen Medikamente mit der gleichen Wirkkomponente entwickeln können.

Die Grundlage für die Widerstandsfähigkeit sind Resistenzgene. Bakterien sind in der Lage diese Gene über verschiedene Mechanismen untereinander auszutauschen. Wenn Bakterien mehrere Resistenzgene erwerben, sind sie gegen mehrere Antibiotika gleichzeitig unempfindlich. Einige Bakterien besitzen eine natürliche Resistenz gegen verschiedene Substanzen, eine zusätzlich erworbene Resistenz schränkt die Behandlungsmöglichkeiten stark ein.

Resistente Bakterien kommen mit zunehmender Häufigkeit vor, und hauptsächlich dort, wo große Mengen an Antibiotika eingesetzt werden. Diese Entwicklung ist weltweit und mit Sorgfalt zu beobachten, da Infektionen mit multiresistenten Erregern schwere und lang anhaltende Erkrankungen zur Folge haben. Eine angemessene Therapie setzt oft verzögert ein, außerdem sind diese Infektionen nicht immer mit verfügbaren Antibiotika behandelbar. Mehr als 25000 Menschen sterben jährlich in der Europäischen Union an Infektionen verursacht von antibiotikaresistenten Bakterien [WHO, 2011].

Der Einsatz von Antibiotika in der Nutztierhaltung führt zum Auftreten von resistenten Bakterien im Darm der Tiere. Während der Schlachtung können sie auf das Fleisch gelangen. So sind besonders Lebensmittel tierischen Ursprungs mit antibiotikasensiblen als auch –resistenten Bakterien kontaminiert und stellen die Hauptroute für die Transmission von resistenten Bakterien und Resistenzgenen vom Tier auf den Menschen dar. Einfluss hat auch der direkte Kontakt mit Tieren bzw. deren Umwelt.

Pflanzliche Lebensmittel können durch tierische Ausscheidungen (Gülle) und Wasser kontaminiert werden und somit auch einen Transmissionsweg darstellen.

Anhand relevanter Literatur soll in dieser Arbeit folgenden Fragen nachgegangen werden:

- *Was sind Antibiotika und wie entstehen Resistenzen?*
- *In welchen Bereichen werden Antibiotika eingesetzt?*
- *Beispiele für antibiotikaresistente Bakterien*
- *Welche Bedeutung haben antibiotikaresistente Bakterien für die menschliche Gesundheit?*
- *Welche Rolle spielen Lebensmittel bei der Übertragung von antibiotikaresistenten Bakterien?*

Im praktischen Teil der vorliegenden Arbeit wird die Prävalenz von Methicillin-resistenten Staphylokokken, Extended-spectrum- β -Lactamase bildenden Enterobakterien und Vancomycin-resistenten Enterokokken in rohem Fleisch von Rind, Kalb, Schwein, Huhn und Pute sowie die mögliche Resistenz weiterer Antibiotika ermittelt.

II. LITERATURÜBERBLICK

1 ANTIBIOTIKA UND ANTIBIOTIKARESISTENZEN

Zu Beginn der Arbeit werden die Begriffe Antibiotikum und Antibiotikaresistenz definiert. Es wird auf die Wirkmechanismen von Antibiotika, Resistenzmechanismen von Bakterien, die Übertragung von Resistenzen und auf die Methoden zum Nachweis von Resistenzen näher eingegangen.

1.1 Definition und Wirkmechanismen

Der Begriff Antibiotikum leitet sich vom Griechischen ab und bedeutet „gegen das Leben“ und bezog sich ursprünglich auf jede Substanz, die von verschiedenen Spezies der Mikroorganismen produziert und das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmt (Bakteriostase) oder diese abtöten (Bakteriozidie) kann [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012]. Schimmelpilze produzieren beispielsweise Penicillin, Bakterien Tetrazykline [WHO, 2011]. Heute gibt es auch synthetisch oder semisynthetisch hergestellte Substanzen mit analoger Wirkung, die sogenannten Chemotherapeutika. Beispiele sind Fluorochinolone und Amoxicillin [GROSS, 2009].

In dieser Arbeit wird der Begriff Antibiotikum als Wirksubstanz zur Behandlung von bakteriellen Infektionen bei Mensch und Tier angesehen und schließt die Chemotherapeutika mit ein.

Die selektive Toxizität, also die spezifische Hemmung oder Abtötung von Mikroorganismen ohne dabei den Menschen zu schädigen, ist von entscheidender Bedeutung [GROSS, 2009]. Dies wird durch strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen ermöglicht. Diese Unterschiede stellen die spezifischen Angriffspunkte der Antibiotika dar. Demnach kann man Antibiotika, wie in Tabelle 1 aufgelistet, nach dem Wirkmechanismus bzw. Angriffspunkt einteilen [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012].

Antibiotika, wie Penicilline, hemmen die Zellwandsynthese, indem sie an Penicillinbindeproteine PBP (Transglykosidasen, Transpeptidasen) binden und somit die Quervernetzung von Aminosäuren im Peptidoglykan der Zellwand stören. Andere hemmen die bakterielle Proteinsynthese oder blockieren die Nucleotidsynthese [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012]. Aminoglykoside (z.B.: Streptomycin, Gentamycin) wirken bakterizid, Makrolide (z.B.: Erythromycin, Azithromycin) wirken bakteriostatisch, indem sie die ribosomale Proteinsynthese stören. Fluorochinolone (z.B.: Norfloxacin, Ciprofloxacin) hemmen die bakterielle Gyrase, die für die Synthese der Nucleinsäure notwendig ist, und wirken somit bakteriostatisch [WILLE, 2007b].

Tab. 1: Wirkmechanismen von Antibiotika
[SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012]

Angriffsziel	Beispiele für Antibiotika
Zellwandsynthese	Penicilline, Cephalosporine, Bacitracin, Vancomycin
Proteinsynthese	Chloramphenicol, Tetracycline, Aminoglykoside, Makrolide, Lincosamide
Zellmembran	Polymyxin, Amphotericin, Imidazole gegen Pilze
Funktion der Nucleinsäuren	Nitroimidazole, Nitrofurane, Chinolone, Rifampicin; einige antivirale Wirkstoffe
Intermediärstoffwechsel	Sulfonamide, Trimethoprim

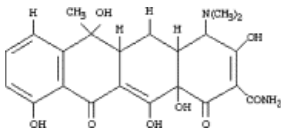
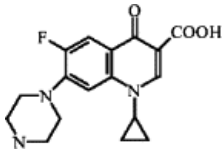
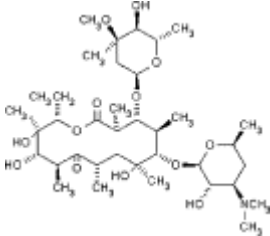
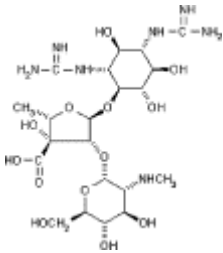
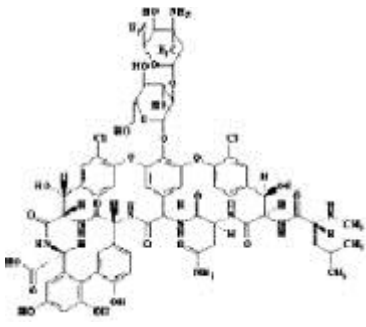
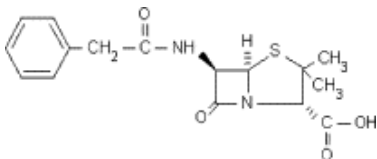
Eine weitere Möglichkeit Antibiotika einzuteilen ist nach ihrem Wirkungsspektrum, so gibt es: Basis-Antibiotika, Breitspektrum-Antibiotika und spezielle Antibiotika. Die Substanzen, die in die Gruppe der Basis-Antibiotika gehören, haben ein relativ schmales Wirkungsspektrum. Es werden nur wenige Spezies gehemmt. Dazu zählen: Penicilline, Cephalosporine der Gruppe 1 und 2, Cotrimoxazol, Tetracycline, Makrolide, Clindamycin [WILLE, 2007a].

Breitspektrum-Antibiotika haben ein breites Wirkungsspektrum, sind aber nicht wirksam gegen alle potentiell pathogenen Mikroorganismen. Sie sollten sparsam und nur zur Therapie von abwehrgeschwächten Patienten und bei Allergien eingesetzt werden. In diese Gruppe gehören folgende Antibiotika: Ureidopenicilline, Cephalosporine der Gruppe 3 und 5, Fluorochinolone, Monobactame, Carbapeneme [WILLE, 2007a].

Die speziellen Antibiotika haben ein schmales Wirkungsspektrum, wirken aber zum Unterschied zu den Basis-Antibiotika auch gegen Stämme mit problematischen Resistenzen wie Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* oder Vancomycin-resistente Enterokokken. Beispiele: Aminoglykoside, Glykopeptide, Streptogramine, Oxazolidinone, Nitroimidazole, Fosfomycin, Fusidinsäure, Mupirocin [WILLE, 2007a].

In der Tabelle 2 sind die Antibiotikaklassen mit je einem Beispiel, die Strukturen und Angriffspunkte zusammengefasst.

Tab. 2: Antibiotikaklassen, Strukturen und Angriffspunkte
[mod. nach BONOMO und GILL, 2005]

Class	Example	Structure	Target
Tetracyclines	Tetracycline		Protein synthesis
Quinolones	Ciprofloxacin		DNA gyrase inhibitors
Macrolides	Erythromycin		Protein synthesis
Animoglycosides	Streptomycin		Protein synthesis
Glycopeptides	Vancomycin		Cell wall biosynthesis
β -Lactams	Penicillin G		Cell wall biosynthesis

1.2 Antibiotikaresistenz von Bakterien

Man versteht unter Antibiotikaresistenz, wenn Mikroorganismen gegenüber bestimmten Antibiotika unempfindlich und somit weiterhin vermehrungsfähig sind. Prinzipiell unterscheidet man zwischen natürlicher/„intrinsischer“ und erworbener Resistenz. Die intrinsische Resistenz ist ein natürliches Phänomen und kommt bei allen Mitgliedern einer Spezies vor. Der Mechanismus dieser Resistenz beruht auf dem physiologischen Aufbau bzw. auf der biochemischen Ausstattung der Spezies. Als Beispiel ist die natürliche Resistenz der Enterokokken gegen Cephalosporine auf Grund ihrer verminderten Bindungsaffinität zu Penicillinbindeproteinen zu erwähnen. Bakterien, die primär nicht resistent sind, können eine Antibiotikaresistenz durch Mutation von Struktur- oder Regulatorgenen oder durch Aufnahme von chromosomaler oder extrachromosomaler DNA-Abschnitte (Plasmide) erwerben. Diese erworbene Resistenz kommt in gewissen Abstammungslinien und nicht in der gesamten Bakterienspezies vor [HARBOTTLE et al., 2006].

Außerdem kann die Unterscheidung in die mikrobiologische, pharmakologische und klinische Resistenz erfolgen:

a. Mikrobiologische Resistenz:

Die normale Empfindlichkeit von Bakterien gegen Antibiotika ist nicht mehr gegeben und liegt somit oberhalb des Breakpoints, der als Grenze einer normalen Empfindlichkeit gilt. Zur Bestätigung der Resistenz können verschiedene genotypische Untersuchungen zum Nachweis von Resistenzgenen angewendet werden [van ELDERE, 2005].

b. Pharmakologische Resistenz:

Grundlagen dieses Resistenztyps sind die normale Empfindlichkeit einer Spezies und die pharmakokinetischen Kenngrößen. Als empfindlich werden jene Erreger betrachtet, bei denen die minimale Hemmkonzentration MHK innerhalb des Konzentrationsbereiches, der im Fall einer Infektion erreicht werden kann, liegt. Im Gegensatz dazu gilt das betreffende Bakterium als resistent, wenn die

MHK des Antibiotikums höher ist als die Konzentration, die im Körper erreicht werden kann [van ELDERE, 2005].

c. Klinische Resistenz:

Die Behandlung von Infektionen mit dem entsprechenden resistenten Erreger kann nicht angemessen erfolgen, wodurch es zu Therapieversagen kommt [van ELDERE, 2005].

Für jede Gruppe von Antibiotika entwickelten sich in den letzten Jahren mindestens ein, oft auch mehrere, Resistenzmechanismen. Es gibt Bakterien, die resistent sind gegen zwei oder mehrere Antibiotika-Klassen. Die Behandlung von Infektionen mit diesen Bakterien ist schwierig, teuer und mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert [ALANIS, 2005].

1.2.1 Resistenzmechanismen

Die Grundlage für bakterielle Resistenzen sind Veränderungen auf genetischer Ebene, entweder durch Mutation oder durch den Einbau neuer genetischer Information.

Die Voraussetzungen eine Antibiotika-Resistenz zu entwickeln sind einerseits die Anwesenheit eines Antibiotikums, das die Mehrheit der anwesenden Bakterien hemmt, und andererseits eine heterogene Kolonie, in der mindestens ein Bakterium die genetische Determinante für die Resistenz trägt. Die empfindlichen Bakterien sterben, währenddessen der resistente Stamm überlebt. Daraus resultiert nicht nur die Selektion dieser Bakterien, sondern auch dieser Gene, die sich nun verbreiten können [ALANIS, 2005; GROSS, 2009].

Folgende Mechanismen können zur Entstehung von Antibiotikaresistenzen bei Mikroorganismen führen:

- Antibiotika-Inaktivierung durch bakterielle Enzyme
- Modifizierung der Zielstruktur
- Veränderung der Zellmembranpermeabilität
- Effluxpumpen

a. Antibiotika-Inaktivierung durch bakterielle Enzyme

Bei diesem Resistenzmechanismus wird das Antibiotikum gespaltet noch bevor es in die Bakterienzelle eindringen kann, zum Beispiel durch das bakterien-eigene Enzym β -Lactamase. Dieses Enzym ist für den Abbau von Penicillin durch die Spaltung des β -Lactam-Ringes und somit für dessen Inaktivierung verantwortlich [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012]. Andere Antibiotika wie Chloramphenicol und Aminoglykoside können durch enzymatische Acetylierung, oder Makrolide durch die Spaltung mittels Esterasen inaktiviert werden. Die genetische Information zur Expression dieser Enzyme kann im Genom oder auf Plasmiden lokalisiert sein, letzteres ermöglicht die Übertragbarkeit zwischen verschiedenen Spezies [GROSS, 2009].

b. Modifizierung der Zielstruktur

Die Zielstruktur bzw. Angriffspunkt des Antibiotikums wird so verändert, dass das Antibiotikum nicht mehr binden kann und unwirksam wird. Wenn das Penicillinbindeprotein durch Mutation verändert wird, resultieren Resistenzen gegen Methicillin beziehungsweise Streptomycin. Beispiel sind Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* MRSA [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012]. Die Vancomycin-Resistenz von Enterokokken beruht ebenfalls auf dem Mechanismus der Modifikation der Zielstruktur [WILLE, 2007a].

c. Veränderung der Zellmembranpermeabilität

Normalerweise gelangen Antibiotika durch Porine (Kanälchen in der Zellwand) in die Bakterienzelle. Wenn Proteine dieser Porine verändert werden, können

Antibiotika nicht mehr in die Zelle eindringen. Sie gelangen nicht an ihren Wirkort und werden somit wirkungslos [GROSS, 2009].

d. Effluxpumpen

Wenn Antibiotika in die Bakterienzelle eindringen, können diese mittels unspezifischer oder spezifischer Transportproteine aus der Zelle gepumpt werden. Somit wird die Antibiotika-Konzentration in der Zelle gering gehalten. Diese aktiven Effluxsysteme sind energieabhängig, sie werden durch protonenmotorische Kraft angetrieben [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012]. Dieser Resistenzmechanismus ist auf Mutationen in Regulator- oder Effektorgen zurückzuführen, dadurch werden Proteine der Effluxpumpen vermehrt exprimiert bzw. das Aminosäureprofil verändert. Antibiotika können effizienter abtransportiert werden [HARBOTTLE et al., 2006].

Eine besondere Form stellt die Multidrug-Efflux-Pumpe (MDR-Pumpe) dar. Sie ist in der Lage Antibiotika unterschiedlicher Strukturen zu binden und aus der Zelle zu pumpen. Diese Pumpen tragen stark zum vermehrten Vorkommen von Resistenzen bei, da sie eine Vielzahl von Substraten erkennen und von bedeutenden Krankheitserregern gebildet werden. Der Mechanismus der MDR-Pumpen ist unter anderem verantwortlich für resistente Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012].

Die Wirkungsweisen der Antibiotika und mögliche Resistenzmechanismen werden in der Abbildung 1 verdeutlicht.

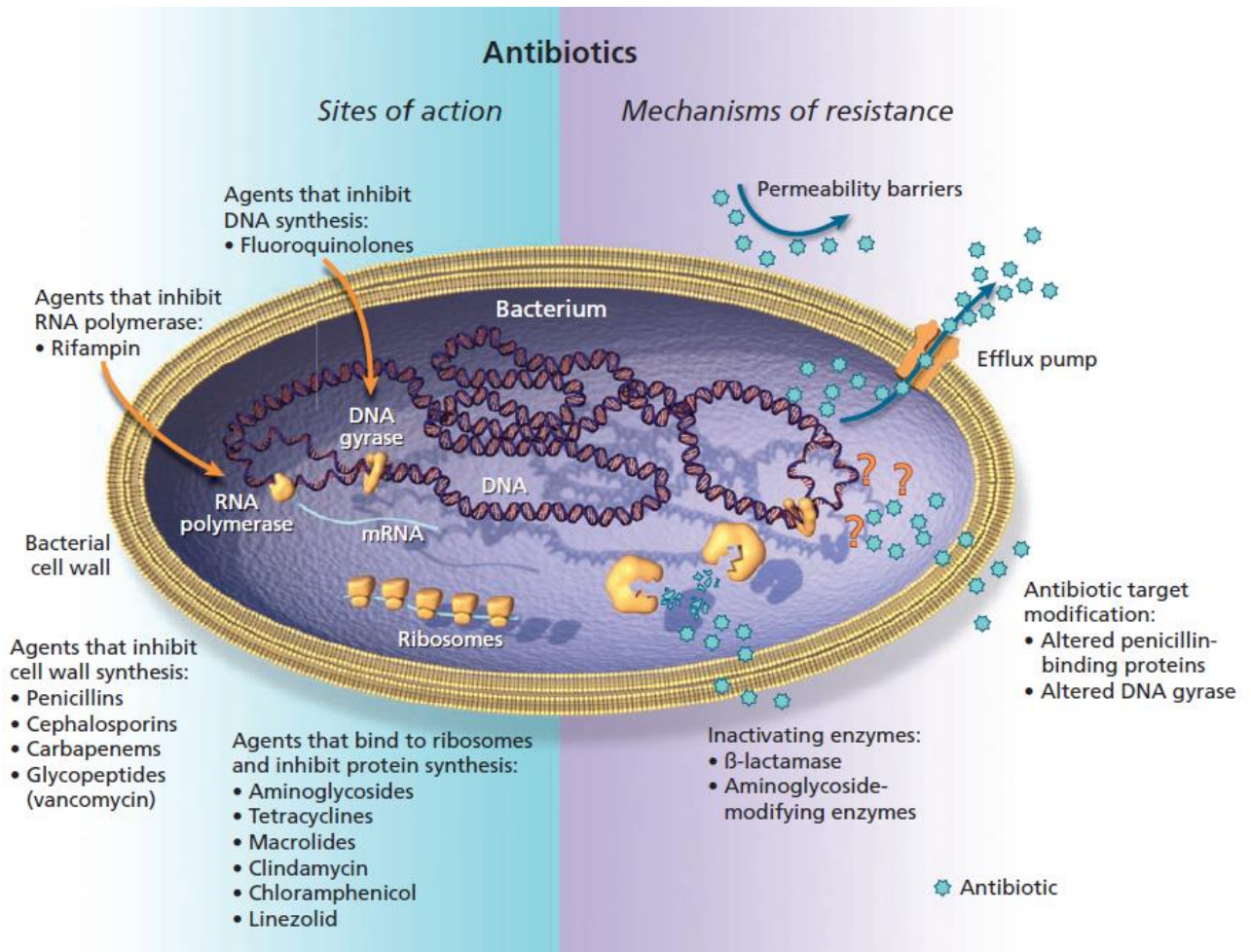


Abbildung 1: Wirkorte von Antibiotika und Resistenzmechanismen [MULVEY und SIMOR, 2009]

Die Wirkungsweisen verschiedener Antibiotika wie die Hemmung der DNA-Synthese, RNA-Polymerase, Zellwand- und Proteinsynthese werden den Resistenzmechanismen wie die Veränderungen der Permeabilität und der Zielstruktur, Effluxpumpen und der Inaktivierung von Antibiotika mittels Enzymen gegenübergestellt.

1.2.2 Resistenztransfer

Bakterien, die die genetische Information zur Ausübung von Resistenzen in sich tragen, können diese an andere Bakterien weitergeben. Der Gentransfer kann sowohl vertikal als auch horizontal erfolgen. Er wird also nicht von der Verwandtschaft der Bakterien eingeschränkt [ALANIS, 2005; GROSS, 2009].

Die Mechanismen des horizontalen Gentransfers sind Konjugation, Transformation und Transduktion.

a. Konjugation

Dieser Mechanismus des Gentransfers wird über Plasmide vermittelt. Plasmide sind DNA-Fragmente extrachromosomalen Ursprungs und können sich unabhängig vom Chromosom replizieren. Die Übertragung der Plasmide von einer Donorzelle auf eine Akzeptorzelle erfolgt über einen Fortpflanzungskanal, den sogenannten Pilus. Der Pilus verbindet kurzzeitig beide Zellen und erlaubt den Austausch von Plasmiden [ALANIS, 2005; GROSS, 2009]. Die Konjugation über Pili erfolgt bei gramnegativen Bakterien. Grampositive Bakterien stellen Zellkontakt über alternative Methoden her, wie zum Beispiel der Pheromon-induzierter Plasmid-transfer bei Enterokokken [VERRAES et al., 2013]. Wenn verschiedene Resistenzgene auf den Plasmiden codiert sind, können durch diesen Mechanismus Mehrfachresistenzen entstehen und vor allem verbreitet werden [ALANIS, 2005; GROSS, 2009].

b. Transformation

Transformation ist die direkte Übertragung von freier DNA – auch nackte DNA genannt. Die nackte DNA wird von anderen Bakterien in naher Umgebung aufgenommen und in deren eigene DNA eingebaut [ALANIS, 2005]. Die nackte DNA wird passiv durch Zelltod und Lyse oder aktiv in bestimmten Zeiten des Wachstumszyklus freigesetzt. Bakterien in der Nähe sind nun in der Lage diese nackte DNA aufzunehmen. Die bakterielle Nuklease in der Zelle hat keinen abbauenden Effekt auf die aufgenommene DNA. Die nackte DNA wird in die DNA der Akzeptorzelle eingebaut und exprimiert [VERRAES et al., 2013].

Die Fähigkeit zur Transformation hängt von einigen Faktoren ab, wie zum Beispiel der Phase des Zellzyklus, Unterschiede in der Struktur der Zellwand zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien und äußeren Einflüssen. Durch verschiedene chemische oder physikalische Parameter wie die Anwesenheit von CaCl_2 , EDTA, Temperaturänderungen oder Elektroschocks kann

die Fähigkeit von *Escherichia coli* zur Transformation angeregt werden [VERRAES et al., 2013].

c. Transduktion

Die Transduktion ist ein weiterer Mechanismus des Gentransfers und basiert auf der Nutzung von Vektoren, hauptsächlich Viren, die in der Lage sind Bakterien zu infizieren. Diese Viren nennt man auch Bakteriophagen. Der Virus enthält bakterielle Gene, die für die Antibiotikaresistenz codieren. Er heftet sich an eine Bakterienzelle an und injiziert dieses genetische Material. Wenn der Virus auch die eigene virale DNA injiziert, so wird die Bakterienzelle gezwungen die DNA des Virus zu produzieren. Die Bakterienzelle stirbt schließlich und setzt die neuen Bakteriophagen frei, die wiederum neue Zellen infizieren können [ALANIS, 2005].

Das *qacB* Gen ist auf Plasmiden lokalisiert und codiert für die Proteine der Multidrug-Efflux-Pumpe. Die Transduktion dieser Plasmide konnte bei *S. aureus* nachgewiesen werden, wodurch die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika stark verringert wurde [NAKAMINAMI et al., 2007]. Beobachtet wurde auch die Übertragung mittels Transduktion von Penicillinase und Tetrazyklinresistenz in *S. aureus* [VARGA et al., 2012].

1.3 Methoden zur Resistenzbestimmung

Für den Nachweis der Antibiotikawirkungen gegen einen bestimmten Erreger können verschiedene in vitro Tests durchgeführt werden. Der Reihenverdünnungstest, auch Bouillondilutionstest genannt, dient zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MHK; minimal inhibitory concentration, MIC). Die MHK dient als Maß für die Antibiotikawirksamkeit und gibt die niedrigste Konzentration des Antibiotikums an, die notwendig ist um das Wachstum eines Erregers zu hemmen. Es wird eine Verdünnungsreihe eines Antibiotikums erstellt. Anschließend wird jedes Teströhrchen mit derselben Menge an Bakterien beimpft. Nach der Inkubation (normalerweise 24 Stunden) kann die MHK bestimmt werden. Eine erkennbare Trübung weist auf eine Vermehrung der

Bakterien hin - die Konzentration des Wirkstoffes war zu gering um das Wachstum zu hemmen. In den Teströhrchen mit hoher Wirkstoffkonzentration bleibt die Lösung durchsichtig, die Vermehrung konnte somit gestoppt werden. Das Röhrchen, das die MHK anzeigt, ist das letzte durchsichtige Röhrchen vor dem Übergang zur Trübung [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012].

Neben dem Reihenverdünnungstest gibt es auch den Streifentest (Epsilon-Test) zur Ermittlung der MHK. Der Streifen enthält einen Wirkstoff-Gradienten. Eine Agarplatte wird frisch beimpft und der Streifen darauf gelegt. Der Wirkstoff diffundiert vom Streifen in das Nährmedium und hemmt somit das Wachstum der Bakterien. Es entsteht ein Hemmhof. Die MHK wird bei jener Konzentration abgelesen, wo der Bakterienrasen am Streifen ansetzt. Dieser Test ist im Vergleich zum Reihenverdünnungstest schneller und weniger aufwendig, da keine Verdünnungen erforderlich sind [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012].

Ein weiterer Test zur Resistenzbestimmung ist der Agardiffusionstest nach der Kirby-Bauer-Methode. Bakterien werden auf eine Agarplatte aufgetragen, darauf setzt man runde Filterpapierblättchen. Diese Blättchen sind mit verschiedenen Antibiotika in bestimmten Konzentrationen versetzt und dementsprechend beschriftet. Durch einen Dispenser wird das Auftragen der Blättchen auf die Agarplatte erleichtert. Als standardisiertes Nährmedium wird der Müller-Hinton-Agar verwendet. Während der Bebrütung diffundieren die Antibiotika radiär in den Nährboden und hemmen das Bakterienwachstum. Es entstehen Hemmhöfe, die je nach Art und Konzentration des Wirkstoffes und je nach Empfindlichkeit des Bakteriums unterschiedlich groß sind. Durch die Standardisierung der Methode kann mittels Hemmhofdurchmesser auf die Antibiotikaempfindlichkeit des Bakteriums geschlossen werden. Die Einstufung erfolgt mit Hilfe von Breakpoints in „resistent“, „intermediär“ und „empfindlich/sensibel“ (siehe Tabelle 3, Seite 15). Diese Breakpoints orientieren sich an erreichbaren Gewebekonzentrationen. Um eine in vivo Wirksamkeit zu erreichen, muss die

Gewebskonzentration größer als die MHK sein [SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012; GROSS, 2009].

Tab. 3: Empfindlichkeit von *Staphylococcus aureus* gegenüber verschiedener Antibiotika
[SLONCZEWSKI und FOSTER, 2012]

Durchmesser des Hemmhofs (mm)				
Antibiotikum	Menge pro Scheibchen (µg)	resistent	intermediär	empfindlich
Ampicillin	10	<12	12-13	>13
Chloramphenicol	30	<13	13-17	>17
Erythromycin	15	<14	14-17	>17
Gentamicin	10	≤12,5		>12,5
Streptomycin	10	<12	12-14	>14
Tetracyclin	30	<15	15-18	>18

Neben diesen Kultivierungsmethoden zur Resistenzbestimmung gibt es auch molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Resistenzgenen. Zu diesen Methoden zählen unter anderem:

- Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)
in unterschiedlichen Ausführungen: simple und multiplex PCR, real-time PCR
- DNA-Sequenzierung
- Hybridisierungstechniken (Macro- und Microarrays)
- Pyrosequenzierung
- Massenspektrometrie [WOODFORD und SUNSDFJORD, 2005].

Molekulare Empfindlichkeitstests bieten eine schnelle und empfindliche Vorgehensweise zum Nachweis von Resistenzen. Der Fortschritt von molekularen Empfindlichkeitstests wird von verschiedenen Faktoren beschränkt. Zu diesen Faktoren zählen die große genetische Vielfalt von Resistenzdeterminanten, geringe analytische Sensitivität und Spezifität von Assays, die Notwendigkeit für ein besseres Verständnis der verwendeten Targets und das Problem der differentiellen Genexpression [LEDEBOER und HODINKA, 2011].

Ein schneller Nachweis von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) ist von hohem klinischem Wert und Voraussetzung für eine angemessene und wirksame Behandlung der Infektion. Bei PCR-Analysen werden die Gene *vanA* und *vanB* als Marker der Vancomycin-Resistenz und für die Identifikation von *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* verwendet. Das Problem hierbei ist jedoch, dass das Vorkommen von *vanA* und *vanB* nicht auf Enterokokken beschränkt ist. So wurde beispielsweise *vanA* auch bei Vancomycin-resistenten *S. aureus* und *vanB* bei *Streptococcus mitis* und *S. bovis* und *Clostridium* spp. nachgewiesen [LEDEBOER und HODINKA, 2011].

Der Nachweis der Methicillin-Resistenz in *S. aureus* kann mit Hilfe des *mecA* Gens oder der Genkassette *Staphylococcus* cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)-orfX erfolgen. Das *mecA* Gen ist wesentlich für die Identifikation der Methicillin-Resistenz bei Staphylokokken, aber nicht spezifisch für *S. aureus*. Der Nachweis kann auch bei resistenten Koagulase-negativen Staphylokokken positiv sein [LEDEBOER und HODINKA, 2011].

Die größte Herausforderung stellt der molekularbiologische Nachweis von Resistenzdeterminanten bei gramnegativen Bakterien dar. Unter den Enterobakterien wurden mehrere hundert Mechanismen, die eine Antibiotikaresistenz hauptsächlich gegen beta-Lactam-Antibiotika, Cephalosporine, Monobactame oder Carbapeneme verursachen, beschrieben. Der Nachweis jedes einzelnen Mechanismus erfordert spezielle Überlegungen. Mehr als 200 verschiedene ESBLs, mit subtilen genetischen Veränderungen, die phänotypi-

sche Unterschiede hervorrufen, wurden bisher beschrieben. Der Unterschied einer einzigen Aminosäure im Enzym (TEM10 und TEM12) kann die MHK um das 10- bis 100-fache (je nach Antibiotikum) abweichen. Deshalb ist die Entwicklung von Techniken, die Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) detektieren und die Resistenz von gram-negativen Bakterien klassifizieren können, wesentlich [LEDEBOER und HODINKA, 2011].

2 EINSATZBEREICHE VON ANTIBIOTIKA

Dieses Kapitel befasst sich mit den wesentlichsten Bereichen, in denen Antibiotika Verwendung finden.

Im Jahr 1997 kamen laut der European Federation of Animal Feed Additive Manufactureres 52% der Antibiotika in der Humanmedizin, 32% in der Veterinärmedizin (therapeutisch und prophylaktisch) und 16% als Wachstums-/Leistungsförderer zum Einsatz. Die Verwendung als Leistungsförderer in der Tierzucht wurde kritisiert und ist seit 2006 europaweit verboten [BMG, 2011].

2.1 Antibiotikaeinsatz in der Humanmedizin

Die Antibiotikatherapie ist bei der Behandlung von Infektionen meist unersetzlich. Die nachfolgenden Tabellen 4 und 5 liefern einen Überblick über die gebräuchlichen Antibiotika in der Humanmedizin.

Tab. 4: Einteilung der in der Humanmedizin verwendeten β -Lactam-Antibiotika
[mod. nach WILLE, 2007a]

GRUPPE	UNTERGRUPPE	WICHTIGSTE DERIVATE
Penicilline	Benzylpenicilline	Penicillin G
	Phenoxyphenicilline	Penicillin V
	Isoxazolylpenicilline	Oxacillin, Flucloxacillin
	Aminobenzylpenicilline	Ampicillin, Amoxicillin
	Carboxypenicilline	Carbenicillin, Ticarcillin
	Acyclamino- (Ureido) penicilline	Mezlocillin, Piperacillin
Cephalosporine	1. Generation	Cefazolin, Cefalexin, Cefadroxil, Cefaclor
	2. Generation	Cefuroxim, Cefotiam, Cefoxitin, Loracarbef
	3. Generation	Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftazidim, Cefsulodin, Cefixim,
	5. Generation	Cefoxitin
Monobactame	—	Aztreonam
Carbapeneme	—	Imipenem, Meropenem
β -Laktamase-Hemmer	—	Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam

Tab. 5: Einteilung der Antibiotika in der Humanmedizin [WILLE, 2007a]

GRUPPE	WICHTIGSTE DERIVATE
Aminoglykoside	Streptomycin, Gentamicin, Tobramycin, Amikacin, Neomycin
Fluorochinolone	Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin
Makrolide	Erythromycin, Roxithromycin, Clarithromycin, Azithromycin
Glykopeptid-Antibiotika	Vancomycin, Teicoplanin
Lincosamide	Clindamycin, Lincomycin
Tetracycline	Tetracyclin, Doxycyclin
Ansamycine	Rifampicin
Folsäureantagonisten	Cotrimoxazol
Nitrofurane	Nitrofurantoin
Nitroimidazole	Metronidazol
Oxazolidinone	Linezolid
Streptogramine	Quinupristin/Dalfopristin
Chloramphenicol	
Fosfomycin	
Fusidinsäure	
Mupirocin	

Antibiotika sind die am häufigsten eingesetzten Medikamente, der Einsatz erfolgt in verschiedenen klinischen Situationen:

- Empirische Therapie:
Diese Behandlung erfolgt bei einer vermuteten oder gesicherten Infektion. Über den Erreger bzw. dessen Empfindlichkeit liegen keine Informationen vor [WILLE, 2007a].
- Erregerspezifische Therapie:
Diese Behandlung erfolgt bei einer gesicherten Infektion. Der Erreger wurde nachgewiesen und die Empfindlichkeit wurde geprüft [WILLE, 2007a].
- Prophylaktischer Einsatz:
Der prophylaktische Einsatz dient als Prävention, beispielsweise im Zuge eines operativen Eingriffs [WILLE, 2007a].

Neben der erwünschten Wirkung haben Antibiotika auch Nebenwirkungen. Typische unerwünschte Effekte einer Antibiotikatherapie können unter anderem sein: allergische Reaktionen, gastrointestinale Beschwerden, Veränderungen des Blutbilds, Schädigung der Organe und Medikamentenfieber. Die Antibiotikatherapie hat aber auch Einfluss auf die körpereigene Bakterienflora, die vor einer Besiedlung mit pathogenen Bakterien schützt. Eine Beeinträchtigung der Darmflora ist abhängig von der Breite des Wirkungsspektrums und der Aufnahmedauer [WILLE, 2007a].

In Österreich werden jährlich ca. 45 Tonnen Antibiotika in der Humanmedizin eingesetzt [AGES, 2013]. Im letzten Jahrzehnt ist die Höhe des Verbrauchs/10000 Einwohner stabil geblieben, jedoch hat sich der Verbrauch der verschiedenen Antibiotika geändert, jener an Tetrazykline und Sulfonamid-Trimethoprim-Präparaten ist stark zurückgegangen während jener an β -Laktam-Antibiotika, Chinolone und anderen Antibiotika sich erhöht hat. Gleichbleibend ist der Verbrauch an Cephalosporinen. Österreich liegt im europäischen Vergleich beim Gesamtverbrauch im unteren Drittel [BMG, 2012].

Nach der Einnahme von Antibiotika wird ein Teil unverändert oder metabolisiert ausgeschieden. Da die Kläranlagen diese Rückstände nicht vollständig entfernen können, besteht die Möglichkeit des Eintrags in Fließgewässer oder Grundwasser [UMWELTBUNDESAMT, 2010]. Außerdem entsorgen 16% der deutschen Haushalte ungebrauchte Medikamente über die Toilette und sind somit für einen unkontrollierten Eintrag in die Umwelt verantwortlich [SCHLOTER und BARLAGE, 2007].

2.2 Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin

Nach der Einführung von Antibiotika in der Humanmedizin in den 1940er Jahren zur Behandlung von Infektionen, wurden sie in der Veterinärmedizin in den 1950er eingeführt [WHO, 2011].

Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über die in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika. Einige finden auch in der Humanmedizin Verwendung.

Tab. 6: Einteilung der Antibiotika in der Veterinärmedizin
[UMWELTBUNDESAMT, 2010]

Stoffgruppen	Wirkstoffe
Aminoglykoside	Apramycin, Dihydrostreptomycin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Spectinomycin, Streptomycin
Cephalosprine	Cefazolin, Cefalexin, Cefotaxim, Cefquinom, Ceftiofur, Cefoxitin, Cephalotin, Dicloxacilin, Difloxacin
Amphenicole	Florfenicol
Chinolone (Gyrasehemmer)	Danofloxacin, Enrofloxacin
Diaminopyrimidinderivate	Baquiloprim, Trimethoprim
Lincosamide	Clindamycin, Lincomycin
Makrolide	Erythromycin, Spiramycin, Tilmicosin, Tylosin
Nitroimidazole	Dimetridazol, Metronidazol
Penicilline	Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Oxacillin, Penicilline (Amino-, Benzyl-, Phenoxypenicilline)
Pleuromutiline	Tiamulin, Valnemulin
Polypeptide (Polymyxine)	Colistin, Polymyxin B
Sulfonamide	Formosulfathiazol, Sulfaclozin, Sulfadimidin, Sulfamethoxazol, Sulfadimethoxin, Sulfamethoxin, Sulfalen, Sulfanilamid, Sulfadiazin, Sulfadoxin, Sulfathiazol
Tetracycline	Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin

Aufgrund der großen Anzahl von Nutztieren in der industrialisierten Produktion wird in einigen Ländern entsprechend viel Antibiotikum eingesetzt. Die eingesetzte Menge bei Tieren, die der Lebensmittelproduktion dienen, übersteigt oft die Menge, die bei Menschen Verwendung findet [WHO, 2011].

Antibiotika finden in der Veterinärmedizin in der Therapie und Metaphylaxe Verwendung. Der Einsatz als Wachstumsförderer ist laut EG-Verordnung Nr. 1831/2003 EU-weit seit 1. Januar 2006 verboten. Wegen einer zunehmenden Diskussion um eine Resistenzbildung als Resultat, der als Leistungsförderer eingesetzten Antibiotika, wurden diese schrittweise verboten [SCHLOTTER und BARLAGE, 2007]. Sie wurden und werden immer noch in einigen Ländern außerhalb der EU in subtherapeutischen Konzentrationen ins Futter gemischt, dadurch soll das Wachstum der Tiere verbessert werden. Der genaue

Mechanismus, durch den das Wachstum und die Fütterungseffizienz beeinflusst werden, ist unklar [WHO, 2011].

Der vermehrte Einsatz als Leistungsförderer ließ die Menge an Antibiotikum um das 50-fache von 110 Tonnen auf 5580 Tonnen im Zeitraum von 1951-1978 in den United States ansteigen. In der gleichen Zeit stieg die Menge zur Behandlung von Infektionen beim Menschen nur um das 10-fache. Zudem wurden Bakterien, die eigentlich empfindlich sind, als resistent beobachtet. In Großbritannien stieg beispielsweise die Prävalenz von *E. coli* resistent gegen Tetracyclin, die von Geflügelproben isoliert wurden, von 3,5% auf 63,2% innerhalb von vier Jahren nach der Einführung in der Geflügelwirtschaft [WHO, 2011]. Als antibiotische Leistungsförderer wurden zwar keine relevanten Antibiotika in der Humanmedizin (Grundsatz des SWANN Komitees 1969), jedoch Substanzen mit analoger Wirkung verwendet. Dadurch und durch die Entstehung von Kreuzresistenzen kam es zur Resistenzbildung gegen humanmedizinisch relevanten Antibiotika; beispielsweise: Avoparcin/ Vancomycin, Tylosin/ Erythromycin. Umgekehrt wurden Antibiotika, die vorher ausschließlich in der Veterinärmedizin Verwendung fanden, auch für die Humanmedizin wichtig. Als Beispiel sind Virginiamycin/Pristinamycin zu erwähnen. Das Verbot wurde nicht ausschließlich aufgrund von wissenschaftlich belegten Daten, sondern als vorbeugende Verbraucherschutzmaßnahme beschlossen. Nicht nur diese mangelnde Datenlage führte zu kontroversen Diskussionen, sondern auch weil das Verbot die Tierzucht vor große Herausforderungen (Bsp: gastrointestinale Störungen in der Jungtieraufzucht/zum Mastbeginn) stellte und die Wirksubstanzen für die Therapie mit jenen der Humanmedizin identisch sind [DOMIG, 2005]. Mögliche Verschlechterungen der Tiergesundheit oder der wirtschaftlichen Produktion durch das Verbot von Leistungsförderer sind allerdings durch Sicherheitsmaßnahmen, Prävention von Krankheiten und Hygiene- und Managementpraktiken vermeidbar. Antibiotikaeinsatz sollte nur zur Behandlung und in therapeutischen Konzentrationen erfolgen [WHO, 2011].

Ein weiterer Einsatzbereich von Antibiotika ist die Metaphylaxe. Unter Metaphylaxe versteht man die Behandlung aller Tiere im Stall, auch wenn nur wenige erkrankt sind, unter der Annahme, dass ansonsten die ganze Herde erkranken würde. Die erkrankten Tiere erhalten individuell eine Behandlung mit einem Antibiotikum, die anderen erhalten das Medikament über das Futter oder das Trinkwasser. Antibiotika werden auch als Prophylaxe bei chirurgischen Eingriffen verwendet [UMWELTBUNDESAMT, 2010; SCHLOTER und BARLAGE, 2007].

In Österreich wurden im Jahr 2010 ca. 63 Tonnen Antibiotika in der Nutztierhaltung eingesetzt, 96% davon in der systemischen Anwendung (parenteral, peroral, intramammär). Die am meisten vertriebenen Antibiotika waren Tetracycline (57,6 %), Makrolide/Linkosamide/Streptogramine (11,4 %) und β -Laktame (10,4 %). Eine Zuordnung der Vertriebsmengen auf einzelne Nutztiergruppen ist nicht möglich, da Antibiotika für mehrere Tierarten zugelassen sind [BMG, 2012].

An Tiere verabreichte Antibiotika werden zum Teil wieder ausgeschieden. Durch die Auftragung von Gülle als Wirtschaftsdünger auf die landwirtschaftlich genutzten Flächen können Antibiotika in das Grundwasser und Oberflächengewässer absickern oder abgeschwemmt werden [UMWELTBUNDESAMT, 2010].

In einem Modellversuch untersuchten Grote et al. die Antibiotikaaufnahme von Nutzpflanzen aus von Gülle-gedüngten Böden. Dazu wurden die Antibiotika Sulfadiazin, Trimethoprim und Chlortetracyclin an Ferkel oral verabreicht. Die Gülle wurde 8 Monate gelagert und dann zur Düngung auf das Feld gebracht. Bodenproben verschiedener Horizonte und Pflanzenproben von Feldsalat und Winterweizen in verschiedenen Wachstumsphasen wurden analysiert. Es konnten Antibiotika-Rückstände nachgewiesen werden, was auf einen möglichen Eintrag von Antibiotika aus der Nutztierhaltung in den Pflanzenanbau hinweist [GROTE et al., 2006].

2.3 Antibiotikaeinsatz in Aquakulturen

Der Einsatz von Antibiotika findet auch in Aquakulturen statt; in Europa bei marinen Kulturen von Lachs, Dorade und Wolfsbarsch und in Asien bei Kulturen von Shrimps. Es werden vor allem Tetrazykline, Sulfonamide, Amoxycyclin, Chloramin T und Fluorfenicol eingesetzt. In Ostasien wird auch Chloramphenicol verwendet. Aufgrund der toxischen Wirkung von Chloramphenicol sind dessen Verwendung in der EU und der Import von solchen Lebensmitteln in die EU verboten [SCHLOTER und BARLAGE, 2007]. Antibiotika werden hauptsächlich als Prophylaxe über das Futter verabreicht, geringere Bedeutung haben Bäder und Injektionen. Während der Aufzucht von Fischen wirken sich Stressoren negativ auf das Immunsystem aus, die Infektanfälligkeit ist dadurch erhöht. Die Mengen an Antibiotika im nicht konsumierten Futter und Fischfäzes reichern sich im Sediment an und können durch die Strömung auch in andere Gebiete verbreitet werden. Diese Rückstände üben Selektionsdruck auf die natürliche Mikroflora im Sediment aus, was die Zusammensetzung der Mikroflora beeinflusst und die Selektion von resistenten Bakterien zur Folge hat [CABELLO, 2006].

Da Fische die Antibiotika nicht effektiv metabolisieren können, schätzt man, dass ca. 75% der über das Futter verabreichten Antibiotika ausgeschieden werden. Die Verwendung von Antibiotika in Aquakulturen ist abhängig von der jeweiligen Regierung, und variiert stark zwischen den Ländern. Das Vorkommen von antibiotika-resistenten Bakterien in Lebensmitteln ist seit längerem bekannt und ein mögliches Gesundheitsrisiko. Eine Untersuchung von ready-to-eat Shrimps zeigte, dass 42% der 1564 Isolate und 81% der Bakterienspezies darunter auch *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* und *Vibrio* spp. Resistenzen gegen Antibiotika aufwiesen. Resistente Fischpathogene können ein Reservoir für Resistenzgene darstellen, die sich weiter ausbreiten und auch auf menschliche Pathogene treffen können. So ist beispielsweise die Übertragung von Resistenzgenen durch Konjugation von dem Fischpathogen *Aeromonas salmonicida* auf *E. coli* oder von *Vibrio anguillarum* auf *Vibrio cholera* möglich [ROMERO et al., 2012].

Angaben zum Antibiotikaverbrauch in Aquakulturen in Österreich sind derzeit nicht möglich. Daten aus Norwegen deuten auf einen Rückgang des Verbrauchs bei gesteigerter Produktion hin [UMWELTBUNDESAMT, 2010]. In der norwegischen Lachs-Produktion konnte die Verwendung von Antibiotika durch effektive Impfstoffe und verbesserte Umgebungsbedingungen reduziert werden [WHO, 2011].

Der Einsatz von Antibiotika wird in der Abbildung 2 der Fischproduktion in Norwegen gegenübergestellt.

In Asien dürften Antibiotika in größeren Mengen eingesetzt werden [UMWELTBUNDESAMT, 2010].

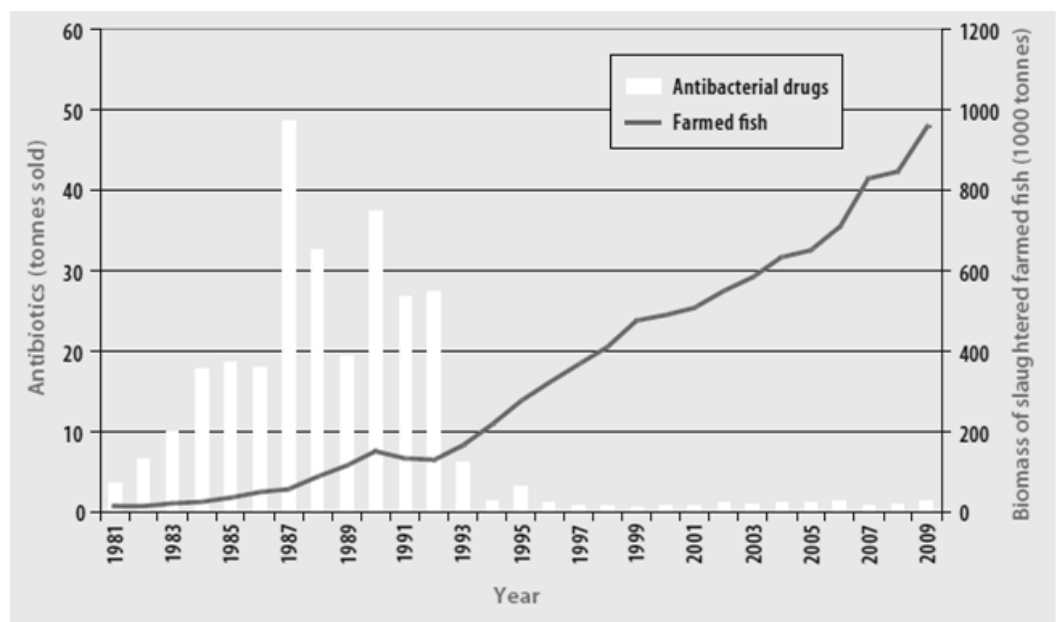


Abbildung 2: Antibiotika für den therapeutischen Einsatz in Fischfarmen und die produzierte Biomasse in Norwegen, 1981-2009 [WHO, 2011]

In Norwegen wurden 1987 und 1990-1992 effektive Medikamente in der Aquakultur eingeführt; dadurch konnte der Einsatz von Antibiotika signifikant verringert werden ohne die Produktion negativ zu beeinflussen. Die Produktion konnte trotz Minimierung des Antibiotikaverbrauchs gesteigert werden.

Ohne den Einsatz von Antibiotika können mit Krankheitspräventions-Maßnahmen ebenfalls eine gute Gesundheitssituation und Wirtschaftlichkeit in Aquakulturen und in der Nutztierhaltung erreicht werden; mit der Ausnahme zur Behandlung kranker Tiere. Durch die Reduktion des Antibiotikaverbrauchs wird auch das Risiko der Verbreitung von Resistenzen verringert [WHO, 2011].

2.4 Antibiotikaeinsatz in der Pflanzenzucht

2.4.1 Einsatz als Pflanzenschutzmittel

Antibiotika werden bereits seit den 1950er Jahren zur Bekämpfung von bakteriellen Erkrankungen von Obst- und Gemüsepflanzen eingesetzt. Heutzutage finden hauptsächlich Oxytetracyclin und Streptomycin in einem Ausmaß von ca. 0,5 % des Gesamtverbrauchs Verwendung. Pflanzen sind eher von Krankheiten durch Pilze oder Viren und weniger durch Bakterien betroffen, was unter anderem den geringen Verbrauch von Antibiotika erklärt [McMANUS et al., 2002].

Der bekannteste Einsatz von Antibiotika im Pflanzenschutz ist die Bekämpfung von *Erwinia amylovora*. Dieser Erreger ist verantwortlich für das Auftreten von Feuerbrand bei Rosenholzgewächsen (Äpfel-, Birnenbäume). Als Wirkstoff des Pflanzenschutzmittels wird das Antibiotikum Streptomycin verwendet [SCHLOTER und BARLAGE, 2007]. Seit 2004 ist jedoch die Verwendung von Streptomycin im Pflanzenschutz EU-weit verboten. Da jedoch dieser Wirkstoff der einzige mit einer Wirkung von über 70% gegen *Erwinia amylovora* ist, kann der Einsatz durch die „Gefahr im Verzug-Regelung“ erfolgen. So wurde der Einsatz von 34 kg Streptomycin im Jahr 2008 nach dem starken Auftreten von Feuerbrand 2007 möglich. Als Voraussetzung gilt eine potentielle Gefährdung der Obstbäume [AGES, 2008]. Zur Verhinderung von Feuerbrand werden die Pflanzen während der Blüte im Frühling mit Streptomycin eingesprüht. Der Einsatz muss prophylaktisch erfolgen, denn Antibiotika sind bei bereits infizierten Bäumen unwirksam. Die Auftragung erfolgt ein- bis dreimal pro Saison. Antibiotika-Rückstände sind auf der Oberfläche der Pflanzen nachweis-

bar, jedoch verlieren sie ihre Wirksamkeit innerhalb einer Woche nach der Auftragung [STOCKWELL und DUFFY, 2012].

Eine Oxytetracyclin-Resistenz bei Pflanzenpathogenen ist selten, während hingegen Streptomycin-resistente Stämme von *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas* spp. und *Xanthomonas campestris* bekannt sind [McMANUS et al., 2002].

2.4.2 Einsatz als Markergen bei genetisch modifizierten Pflanzen

Genetische Modifikation in Pflanzen setzt die Übertragung von ausgewählten Genen in eine Rezipientenzelle voraus. Verschiedene Mechanismen stehen hierfür zur Verfügung, wie die Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* zur Einschleusung von Genen in eine Zelle oder der direkte Gentransfer durch Partikelbeschuss mittels gene guns. Da diese Übertragung nicht bei allen Zellen erfolgreich ist, ist eine Trennung der Zellen erforderlich. Hierfür kommen Markergene, die mit den zu transferierenden Genen auf die Rezipientenzelle übertragen werden, zum Einsatz. Häufig werden Antibiotikagene als Marker eingesetzt, ein Beispiel ist das *nptII*-Gen (neomycin phosphotransferase II). Dieses Gen codiert für das Enzym Neomycin-Phosphotransferase, das Antibiotika der Gruppe Aminoglykoside (Neomycin, Kanamycin) inaktivieren kann. Die Selektion von den gen-technisch modifizierten Zellen erfolgt auf einem Kanamycin-angereicherten Medium, da die Kanamycin-Konzentration auf nicht-modifizierte Zellen letal wirkt [GAY und GILLESPIE, 2005].

Diese Antibiotikaresistenzgene stellen ein mögliches Sicherheitsproblem dar. Sie sind meist auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert und könnten durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch modifizierten Pflanzenzellen auf Bakterien übertragen werden. Hierfür müsste das Markergen auf ein Empfängerbakterium treffen, aufgenommen und in dessen Genom integriert werden, bevor das Gen exprimiert werden könnte. Diese Möglichkeit besteht zwar, jedoch ist die Häufigkeit sehr gering und konnte unter Feldbedingungen nicht beobachtet werden [GAY und GILLESPIE, 2005].

Auch wenn der größte Anteil am Resistenzproblem von der Humanmedizin verursacht wird, könnten die Markergene eine Quelle an Antibiotikaresistenzen darstellen. Die Verwendung von *nptII* als Markergen bei gentechnisch modifizierten Pflanzen ist erlaubt, obwohl Aminoglykoside eine entscheidende Rolle in der Prävention und Behandlung von kritischen Zuständen wie multiresistente Tuberkulose oder hepatische Enzephalopathie, haben [OLIVEIRA und MAIRHOFER, 2013].

3 AUSGEWÄHLTE ANTIBIOTIKARESISTENTE BAKTERIEN

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*, Extended-spectrum- β -Lactamase-bildenden Enterobacteriaceae und Vancomycin-resistenten Enterokokken. Die Bakterien, Antibiotika und Resistenzmechanismen werden beschrieben.

3.1 Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* MRSA

Staphylococcus aureus ist ein gram-positives, Koagulase-positives Bakterium und verantwortlich für multiple Erkrankungen, wie Haut- und Wundinfektionen, Sepsis, Osteomyelitis und Pneumonie. Bestimmte Stämme sind in der Lage neben den Gewebetoxinen (Hämolysin, Fibrinolysin, Leukozidin) auch Enterotoxine, die mit lebensmittelbedingten Intoxikationen assoziiert sind, zu produzieren [CRAGO et al., 2012].

Die ersten *S. aureus*-Stämme, die resistent gegen Penicillin waren, wurden 1941, nur zwei Jahre nach der Einführung von Penicillin in der klinischen Therapie, entdeckt. Die Penicillin-Resistenz wird über Plasmide vermittelt, dadurch erfolgt die Verbreitung der Resistenz relativ schnell. In den 1980er waren ca. 90% der aus Patienten isolierten *S. aureus*, resistent. Die Methicillin-Resistenz ist hingegen chromosomalbedingt, und deshalb erfolgt die Verbreitung langsamer. Methicillin ist ein halbsynthetisches Antibiotikum und Penicillinase-stabil. Es wurde in den 1960er Jahren zur Behandlung von Infektionen mit Penicillin-resistenten *S. aureus* eingeführt [PESAVENTO et al., 2007].

20% der *S. aureus* Stämme sind empfindlich gegen Penicillin, weil sie keine β -Laktamase bilden. Methicillin-sensible *S.aureus* (MSSA) machen ca. 60% der Stämme aus. Sie bilden β -Laktamase, sind jedoch empfindlich gegen

Methicillin. 20-25% aller *S. aureus* Stämme sind Methicillin-resistent [GROSS, 2009].

Die Methicillinresistenz wird durch die Aufnahme einer mobilen Genkassette (*Staphylococcus cassette chromosome mec*, SCCmec) und dessen Einbau in die chromosomale DNA verursacht. Diese Kassette enthält das sogenannte *mecA* Gen. Dieses Gen codiert für das Penicillinbindepotein PBP 2a mit geringer Affinität zu β -Laktamantibiotika. MRSA sind somit resistent gegen alle β -Laktamantibiotika (Penicilline und Cephalosporine) [BOER et al., 2009; FETSCH, 2012].

Wenn *S. aureus* über Lebensmittel in den menschlichen Körper gelangen, werden diese durch den Magensaft abgetötet. Bei immungeschwächten Patienten gelangen diese Bakterien jedoch in den Blutkreislauf und lösen Infektionen aus [PESAVENTO et al., 2007]. MRSA konnte bereits in rohen Fleischproben in Asien, Kanada, Europa und USA nachgewiesen werden, mit einer Prävalenz von 1% in Asien bis zu 12% in den Niederlanden. Das Vorkommen von MRSA ist nicht auf eine Tierart beschränkt, sondern in Schweine-, Hühner- und Rindfleisch nachweisbar [HANSON et al., 2011]. Neben den Nutztieren können auch Haustiere wie Katzen und Hunde betroffen sein. Der Unterschied hierbei besteht darin, dass die Nutztiere symptomlose Keimträger sind während Haustiere an der MRSA-Infektion erkranken. Der Grund dafür ist, dass sich die nachgewiesenen Typen zwischen Nutz- und Haustieren unterscheiden. Jene die hauptsächlich von Haustieren isoliert wurden, kommen auch beim Menschen vor. Der MRSA-Typ in Nutztieren (livestock-associated MRSA, la-MRSA) ist eher selten mit Erkrankungen des Menschen assoziiert, jedoch kann der Kontakt mit lebenden Tieren sowie rohem Fleisch ein Risiko für eine MRSA-Infektion darstellen [BfR, 2008]. So liegt bei Tierärzten und Landwirten, die in MRSA-positiven Anlagen tätig sind, zu 86% eine nasale Besiedlung mit la-MRSA vor. Diese erfolgt hauptsächlich über die Inhalation von kontaminiertem Staub [WITTE und CUNY, 2013].

MRSA in der Bevölkerung wird auch community-acquired-MRSA (ca-MRSA) genannt und ist meist mit tiefgehenden Haut- und Weichgewebe-

Infektionen verbunden. MRSA in Krankenhäusern (nosokomiale Infektionen) werden als hospital-acquired-MRSA (ha-MRSA) bezeichnet und sind innerhalb des Gesundheitswesens verbreitet [WITTE und CUNY, 2013].

Ha-MRSA Stämme tragen die *SSCmec* Genkassette des Typs 1, 2 oder 3. Jeder Typ enthält das *mecA* Gen. Diese Stämme weisen oft eine Resistenz gegen mehrere Klassen der nicht- β -Laktam Antibiotika auf. Die *SSCmec* Genkassette des Typs 4 oder 5, die die ca-MRSA Stämme aufweisen, sind im Vergleich zu den Typen 1-3 kleiner und tragen ebenfalls das *mecA* Gen. Einige Daten weisen darauf hin, dass die Genkassetten des Typs 4 und 5 mobiler sein könnten. Eine Resistenz gegenüber Antibiotikaklassen außer den β -Laktamantibiotika ist seltener. Neben diesen genotypischen Unterschieden gibt es auch klinische. Von ca-MRSA Infektionen sind bis dahin gesunde jüngere Patienten betroffen und hauptsächlich mit Haut- und Weichteilinfektionen, aber auch mit schweren klinischen Syndromen wie nekrotisierender Pneumonie und schwerer Sepsis assoziiert. Im Gegensatz dazu werden ha-MRSA überwiegend von älteren Patienten in gesundheitlichen Einrichtungen isoliert und sind verantwortlich für Pneumonien, Bakteriämien und invasive Infektionen [DAVID und DAUM, 2010].

3.2 Extended-spectrum- β -Lactamase (ESBL) bildende Enterobakterien

Enterobakterien sind gramnegative Stäbchen und besiedeln den Darm von Mensch und Tier. Die Familie der Enterobacteriaceae umfasst ca. 100 Spezies, darunter auch Opportunisten, die schwere Infektionen bei Menschen mit geschwächter Abwehr auslösen können.

Extended-spectrum- β -Lactamase (ESBL-) bildende Bakterien sind Bakterien mit der Fähigkeit β -Laktamasen mit erweitertem Wirkungsbereich zu produzieren. β -Laktamasen sind Enzyme, die β -Laktam-Antibiotika hydrolytisch spalten. Diese Enzyme können neben den Penicillinen auch Cephalosporine zerstören, dadurch wird die Therapie von Infektionen stark eingeschränkt [WILLE, 2010].

Jedoch muss eine EBSL-Bildung nicht gleichzeitig eine Resistenz gegen Monobaktame und Cephalosporine der Gruppe 3 (Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon) und 4 (Cefepim, Cefpirom) zur Folge haben; diese phänotypische Ausprägung kann stark variieren. Aufschluss bietet ein Antibiotogramm. Zu den Bakterien, die diese Resistenz entwickeln können, zählen Enterobacteriaceae sowie Pseudomonaceae und andere Nonfermenter [WILLE, 2010]. Die Antibiotika, die der Gruppe der β -Laktamantibiotika angehören, sind in der Tabelle 4 (Seite 18) aufgelistet. Cephalosporine werden in Gruppen oder auch Generationen gegliedert. Die Gruppen 1 (z.B. Cefazolin, Cefaclor) und 2 (z.B. Cefuroxim, Cefotiam) sind die sogenannten Basis-Cephalosporine. Durch ihr breites Wirkungsspektrum sollten sie nur Verwendung finden, wenn Antibiotika mit schmalen Spektrum nicht ausreichen. Die Gruppen 3 (z.B. Ceftriaxon, Ceftazidim) und 4 (z.B. Cefoxitin) sind im Gegensatz dazu die Breitspektrum-Cephalosporine. Ihre Wirksamkeit gegen Enterobakterien ist deutlich besser im Vergleich zu den Basis-Cephalosporinen. Bei dem Antibiotikum Cefoxitin kommt hinzu, dass es gegen β -Lactamase stabil ist [WILLE, 2007b].

Penicillin ist das einfachste β -Laktam-Antibiotikum. Bereits wenige Jahre nach dessen Einführung 1940 traten Resistenzen durch die Bildung der ersten β -Laktamase (Penicillinase) auf. Zur Sicherstellung von wirksamen Medikamenten wurden neue Antibiotika mit gleicher Grundstruktur jedoch andere Substitutionen entwickelt. Die β -Laktamasen und somit die durch diese Enzyme vermittelte Resistenz werden durch β -Laktamase-Hemmer wie z.B. Clavulansäure blockiert [WILLE, 2010].

Ein Grund dieser Resistenz ist die Expression von ampC- β -Laktamasen, die chromosomal codiert sind. Eine Mutation bewirkt eine Überexpression, wodurch es zur Resistenz kommt [WILLE, 2010]. Sitzt die genetische Information zur EBSL-Bildung auf dem Chromosom, kann diese Art der Resistenz nur durch vertikalen Gentransfer, also bei der Vermehrung durch Teilung an die Tochtergeneration, weitergegeben werden [SCHRAUDER und VONBERG, 2009].

Ein weiterer Grund ist die Aufnahme von Plasmiden, die die extended-spectrum- β -Lactamase codieren [WILLE, 2010]. Diese Möglichkeit der Übertragung ist nicht an Speziesgrenzen gebunden (s.o. Konjugation). Das Resistenzplasmid kann beispielsweise von *Klebsiella pneumoniae* auf *Escherichia coli* und auch umgekehrt übertragen werden. Die Verbreitung der Resistenz erfolgt relativ einfach und schnell [SCHRAUDER und VONBERG, 2009]. Die Enzyme können nach den Derivaten in die Gruppen TEM, SHV oder CTX-M β -Laktamasen unterteilt werden. Letztere zählen zu den am häufigsten vorkommenden ESBL-Typen in den europäischen Staaten und werden je nach Sequenz der Aminosäuren in fünf Subgruppen gegliedert: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 und CTX-M-25 [BfR, 2012].

Die Bildung von ESBL wird hauptsächlich bei *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *oxytoca*, sowie bei *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella enterica*, *Enterobacter* spp. und *Morganella morganii* beobachtet [WILLE, 2010]. ESBL-bildende Bakterien kommen primär im Verdauungstrakt vor, außerdem in den ableitenden Harnwegen sowie im Respirationstrakt [SCHRAUDER und VONBERG, 2009]. Heutzutage sind mehr als 50% der Harnwegsinfektionen verursachenden *E.coli* Ampicillin-resistent [WITTE und PFEIFER, 2013]. ESBL-bildende Bakterien kommen vermehrt in Krankenhäusern und dort vor allem auf Intensivstationen vor. Hoher Selektionsdruck durch hohen Antibiotikaeinsatz und das geschwächte Immunsystem der Patienten werden als Gründe diskutiert [SCHRAUDER und VONBERG, 2009]. Mehrere Studien konnten aber auch ESBL-bildende Erreger in Tieren und Lebensmitteln mit zunehmendem Vorkommen nachweisen [STUART et al., 2012; LAVILLA et al., 2008]. Das BfR untersuchte im Zeitraum von 2000 - 2008 *Salmonella*-Isolate von Lebensmittelproben auf Antibiotikaresistenzen; 1,2% der Isolate waren resistent gegen Cephalosporine. Die Ergebnisse der Jahre 2009 und 2010 waren ähnlich. Zusätzlich wurden ESBL-bildende kommensale *E. coli* nachgewiesen. Isolate aus Masthähnchen waren zu 5,9% resistent gegen Ceftazidim im Jahre 2009, und zu 13,5% im Jahre 2010. Diese Bakterien konnten auch bei Legehennen und Mastkälbern und bei Puten- und Schweinefleisch nachgewiesen werden.

Lebensmittel, hauptsächlich tierischen Ursprungs, stellen somit eine mögliche Infektionsquelle dar. Das Infektionsrisiko ist aber mit derzeitigem Wissensstand nur schwer abschätzbar. Eine weitere mögliche Infektionsquelle stellen die Haustiere dar, bei denen auch ESBL-bildende Bakterien nachgewiesen werden konnten [BfR, 2012].

3.3 Vancomycin-resistente Enterokokken VRE

Enterokokken sind grampositive und fakultativ anaerobe Bakterien. Sie besiedeln die Darmflora von Menschen und Tieren. Durch eine Verschleppung aus dem Colon in andere Regionen können Enterokokken unter anderem Harnwegsinfektionen, Peritonitis und Endokarditis verursachen. Als Krankheitserreger sind hier vor allem *E. faecium* mit 85-90% und *E. faecalis* mit 5-10% der klinischen Isolate zu erwähnen [SIMON et al., 2004; CETINKAYA et al., 2000]. Enterokokken besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber semisynthetischen Penicillinen, Monobactamen und allen Cephalosporinen und sind die zweit- bis dritthäufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen [KLARE et al., 2012].

Vancomycin ist ein Antibiotikum der Glykopeptid-Gruppe und ist gegen grampositive Bakterien wirksam. Durch die Bindung von Vancomycin an das Ende von Peptidoglykan-Vorstufen wird der Aufbau der Zellwand verhindert. Wenn die Struktur dieser Bindungsstelle verändert wird, kann Vancomycin nicht mehr binden und ist unwirksam. Es gibt verschiedene Resistenzmechanismen, wobei den Genen *vanA* und *vanB* die größte klinische Bedeutung zu kommen. Das *vanA*-Gen ist auf Plasmiden oder Transposons codiert, wodurch eine Übertragung auf andere grampositive Bakterien möglich ist, beispielsweise auch auf MRSA. Die genetische Information für den *VanB*-Resistenztyp ist auf Chromosomen lokalisiert, eine Übertragung auf andere Enterokokken ist möglich [SIMON et al., 2004]. Neben den *vanA* und *vanB*-Typen gibt es noch sechs weitere erworbene Resistenzarten (*vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*). Bei den *vanC*₁- und *vanC*₂-Typen handelt sich um intrinsische Resistenzmechanismen bei *E. gallinarum* bzw. *E. casseliflavus*. Durch die natürliche Resistenz gegen-

über vielen Antibiotika hat eine zusätzliche Vancomycin-Resistenz dramatische Auswirkungen auf die therapeutischen Möglichkeiten. In diesem Fall stehen nur noch sehr wenige Chemotherapeutika (Quinupristin/Dalfopristin, Linezolid, Tigecyclin, Daptomycin) zur Auswahl [KLARE et al., 2012].

Es besteht ein epidemiologischer Unterschied zwischen dem Vorkommen von VRE in den USA und in Europa. Während sich in den USA VRE innerhalb und zwischen Spitälern aufgrund des hohen Antibiotikaeinsatzes verbreiteten, wurden VRE in europäischen Staaten bei nicht-hospitalisierten Menschen, Bauern, Nutztieren, Fleischprodukten und Abwasserkläranlagen nachgewiesen. Außerdem unterscheiden sich die Vancomycin-resistenten Enterokokken, die beim Menschen nachgewiesen wurden, nicht von jenen in der Umwelt, Tieren oder Fleischprodukten. Die Vermutung, dass VRE von Tieren auf den Menschen über die Lebensmittelkette übertragen werden können, ist somit nahe liegend. Als Grund für diesen epidemiologischen Unterschied wird Avoparcin diskutiert [MESSI et al., 2006].

Avoparcin ist wie Vancomycin ein Glykopeptid-Antibiotikum. Es wurde in der EU bis 1997 in der Tierhaltung als Wachstumsförderer eingesetzt. Durch die Möglichkeit einer Kreuz-Resistenz von Avoparcin und Vancomycin kommt es zur Vancomycin-Resistenz. Unter Kreuz-Resistenz versteht man die Fähigkeit durch ein Resistenzgen Unempfindlichkeit gegen zwei oder mehr Antibiotika derselben Klasse zu entwickeln. Durch eine mögliche Resistenzentwicklung gegenüber Vancomycin von Enterokokken durch dessen Einsatz und den Eintrag in die Nahrungskette (Wasser, kontaminierte Lebensmittel) wurde Avoparcin EU-weit verboten. Es konnten VRE in Hühner- und Schweinefleisch sowie in Stuhlproben von Haustieren nachgewiesen werden. Das Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken in der kommensalen Flora von gesunden Menschen stieg ebenfalls an, trotz einem geringen Einsatz von diesem Antibiotikum in der Humanmedizin [WHO, 2011; SIMON et al., 2004]. Dieses Verbot führte zum Rückgang von VRE in Nutztieren und in der Bevölkerung [WHO, 2011].

Die Abbildung 3 verdeutlicht den Einsatz von Avoparcin und das Auftreten von Glykopeptidresistenz in Dänemark. Dänemark und Norwegen haben bereits 1995 die Verwendung von Avoparcin als Leistungsförderer verboten [WHO, 2011].

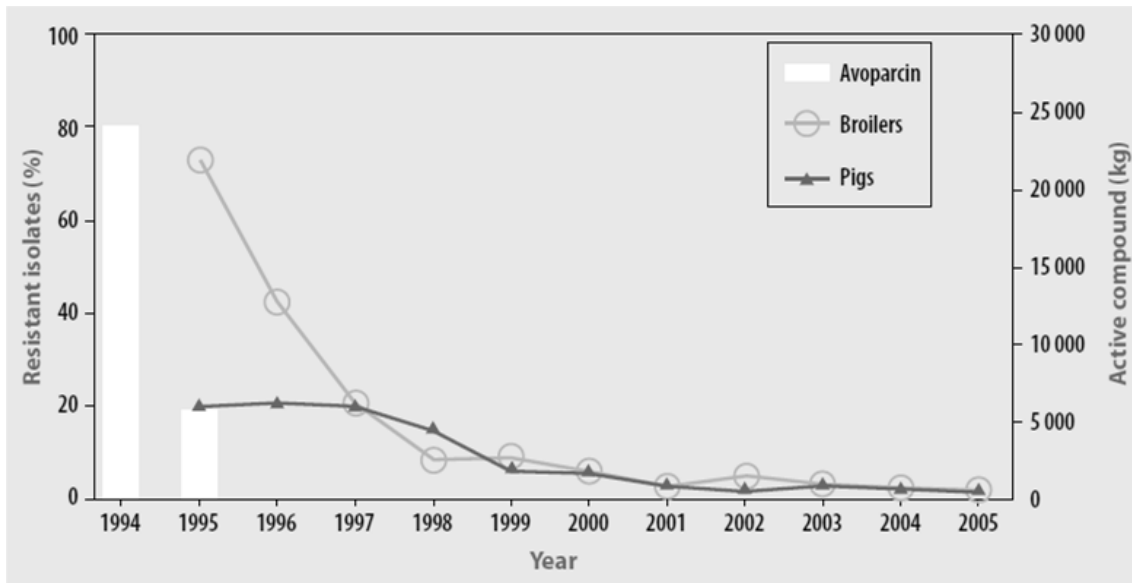


Abbildung 3: Einsatz von Avoparcin und die Entwicklung der Glykopeptid-Resistenz in Dänemark, 1994-2005 [WHO, 2011]

In Dänemark wurden 1994 25000kg des Leistungsförderers Avoparcin eingesetzt, 1995 waren es 5000 kg und danach wurde der Einsatz von Avoparcin verboten. Mit Rückgang von Avoparcin ging auch die Anzahl resistenter Isolate bei Schweinen und Masthähnchen deutlich zurück.

4 ANTIBIOTIKARESISTENTE BAKTERIEN – GESUNDHEITLICHE BEDEUTUNG UND RISIKO FÜR DEN MENSCHEN

In diesem Kapitel wird auf die gesundheitlichen Auswirkungen und auf die Prävalenz von antibiotikaresistenten Bakterien in Europa näher eingegangen.

Die Einführung von Antibiotika zur Behandlung von Infektionskrankheiten in den 1940er Jahren veränderte die Medizin. Nur wenige Jahre danach entstanden durch den Gebrauch und Missbrauch Resistenzen, die sich rasch ausbreiteten. Die Folgen von Antibiotikaresistenzen sind Therapieversagen oder schwerere und länger anhaltende Erkrankungen, wodurch Hospitalisierungsraten, Todesfälle und Kosten deutlich ansteigen. Mehr als 25000 Menschen sterben jährlich in der Europäischen Union an Infektionen verursacht von antibiotikaresistenten Bakterien. Reserve—Antibiotika, die zur alternativen Therapie eingesetzt werden, sind oft weniger effektiv, teurer und toxischer. Jede Art von Gebrauch bei Menschen, Tieren und Pflanzen kann die Entwicklung von Resistenzen fördern [WHO, 2011].

4.1 Gesundheitliche Auswirkungen von Antibiotikaresistenzen

Die Zusammensetzung der menschlichen Darmflora besteht aus ca. 400 verschiedenen Bakterienspezies und Subspezies mit einer Gesamtkeimzahl von 10^{12} - 10^{13} und hängt von einigen Faktoren, wie zum Beispiel der Ernährung und des Alters, ab. Je nach Abschnitt des Verdauungstraktes sind verschiedene Bakterien vertreten, so überwiegen im Magen und Duodenum Laktobakterien und grampositive Kokken, im Jejunum Laktobakterien, Streptokokken und wenige Anaerobier, im Ileum grampositive Kokken, Enterobacteriaceae, *Bacteroides spp.* und andere Anaerobier und im Kolon Enterobacteriaceae, *Lactobacillus*, *Bacteroides spp.*, Streptokokken, Enterokokken, Staphylokokken und ande-

re. Durch die dichte Besiedlung des menschlichen Verdauungstraktes können exogen aufgenommene Bakterien den Darm nicht dauerhaft besiedeln. Die Passage durch den Verdauungstrakt beträgt jedoch 24-48 Stunden, in denen resistente Bakterien die Resistenzgene auf andere Bakterien übertragen können. Wenn das Gleichgewicht der Darmflora gestört wird, können daraus schwere Erkrankungen resultieren [AUTENRIETH, 2000]. Die Darmflora kann beispielsweise durch eine Behandlung mit Antibiotika, durch eine radikale Änderung der Ernährung oder durch eine Strahlentherapie aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Die natürliche Barriere kann gestört werden, wodurch die Ansiedlung von potentiell pathogenen Bakterien ermöglicht wird. Die Auswirkungen von Antibiotika auf die Darmflora sind unterschiedlich, so beeinflussen Clindamycin, Erythromycin, Cefoperazone, Ceftriaxon und Moxalactam die menschliche Darmflora besonders stark. Die Einnahme von Antibiotika hat einen Selektionsdruck zur Folge, wodurch es zur Vermehrung von resistenten Bakterien und zum Transfer von Resistenzgenen auf die normale Darmflora oder auf pathogene Keime kommen kann [SCHJØRRING und KROGFELT, 2011].

Wie bereits erwähnt führt der Einsatz von Antibiotika als Leistungsförderer zum vermehrten Auftreten von resistenten Bakterien im Darm der Nutztiere. Während der Schlachtung können diese resistenten Bakterien ins Lebensmittel gelangen und somit in die Lebensmittelkette. Werden die Fleischprodukte zu wenig erhitzt bzw. Obst und Gemüse, die mit kontaminiertem Wasser gegossen wurden, zu wenig gereinigt, gelangen resistente Bakterien durch den Konsum in den menschlichen Verdauungstrakt. Dort besteht die Möglichkeit, dass sie sich mit der normalen Darmflora vermischen und Gene übertragen oder aufnehmen. Es werden auch Resistenzgene innerhalb der normalen Darmflora ausgetauscht. Einige Bakterien der normalen Darmflora sind opportunistische Pathogene, die vor allem nach Operationen schwere Infektionen auslösen können. Wenn diese Bakterien Resistenzen tragen, wird die Behandlung erschwert. Bakterien, die mit der Nahrung aufgenommen werden, passieren den Darm. Die Dauer der Passage durch den Kolon ist lang genug um den Transfer oder den

Erwerb von Genen mittels Konjugation zu ermöglichen. Durch die Ausscheidung und fäkal-orale Kontamination können resistente Bakterien unter anderem in den Mund oder auf die Haut gelangen, wo es wieder zum Gentransfer kommen kann. Salyers et al. stellten diese Reservoir-Hypothese auf, in der der Darm ein Reservoir für Antibiotikaresistenzgene darstellt [SALYERS et al., 2004].

Hirsh et al. untersuchten 1974 die Übertragung von Resistenzen bei freiwilligen Versuchspersonen. Der Transfer der Tetrazyklin-Resistenz von *E. coli* tierischen Ursprungs auf *E. coli* der menschlichen Darmflora konnte während einer Tetrazyklin-Behandlung beobachtet werden. Der Transfer fand nur bei einer therapeutischen Konzentration (1000mg/d) und nicht bei geringerer Konzentration statt [HIRSH et al., 1974].

Ein klinischer Fall eines einjährigen Buben mit Spina bifida und Kloakaler Ekstrophie bietet ein Beispiel für die Möglichkeit des Gentransfers unter Selektionsdruck. Es konnten ESBL-bildende *K. pneumoniae* aufgrund von ACC-1 AmpC nachgewiesen werden. Die postoperative Behandlung mit Imipenem und Amikacin führte zur verminderten Empfindlichkeit von *K. pneumoniae* gegenüber Imipenem aufgrund spontaner Mutation. Das Kleinkind erkrankte zusätzlich an Harnwegsinfektionen ausgelöst durch Ampicillin-resistente *E. coli*. Die Behandlung erfolgte mit Cefotaxime und Gentamycin. Nach der Behandlung konnte der *in vivo* Transfer von ACC-1 AmpC von *K. pneumoniae* auf *E. coli* nachgewiesen werden [BIDET et al., 2005]. Dieser Fall hebt die Komplexität des Resistenzgentransfers im menschlichen Verdauungstrakt hervor.

Es wurden auch einige Tierstudien zur Ermittlung der Resistenzübertragung durchgeführt. Schjørring et al. untersuchten die Übertragung von Resistenzplasmiden von *K. pneumoniae* auf *E. coli* im Verdauungstrakt von Mäusen. Die Versuchstiere wurden in Gruppen unterteilt, eine erhielt eine Antibiotikatherapie, die andere nicht. Danach wurden die multiresistenten *K. pneumoniae*-Isolate verabreicht. In der Gruppe, die keine Antibiotikatherapie bekam, konnte bereits nach wenigen Tagen keine resistenten *K. pneumoniae* mehr nachge-

wiesen werden. Grund dafür dürfte die natürliche Darmflora gewesen sein. Bei den Mäusen mit Antibiotikatherapie konnten resistente *K. pneumoniae* im Ausmaß von 10^9 KBE/g Fäzes nachgewiesen werden. 23 Tage nach der Verabreichung von multiresistenten *K. pneumoniae*-Isolaten konnten endogene *E. coli*-Transkonjuganten mit dem nahezu gleichem Resistenzprofil wie *K. pneumoniae* beobachtet werden [SCHJØRRING et al., 2008].

Durch die Übertragbarkeit von Resistenzgenen können sich resistente Bakterien verbreiten. Vor allem in Krankenhäusern kommen resistente Keime vor. Durch Selektionsdruck aufgrund des hohen Antibiotikaeinsatzes und immungeschwächte Patienten, können diese Bakterien zu Infektionen führen. Infektionen mit resistenten Erregern resultieren in schwereren und länger anhaltenden Erkrankungen, in steigenden Hospitalisierungsraten, höheren Mortalitätsrate und steigenden Kosten [WHO, 2011]. Rund 70% der Bakterien nosokomialer Infektionen sind unempfindlich gegen mindestens ein antibakterielles Medikament und die Zahl multiresistenter Bakterien ist im Steigen. Besonders in den letzten 20-30 Jahren stiegen die Resistenzraten verschiedener Bakterienarten deutlich an [SCHLOTTER und BARLAGE, 2007].

So ist zum Beispiel eine MRSA-Bakteriämie assoziiert mit einem 1,5-fachen längeren Krankenhausaufenthalt (19,1 versus 14,2 Tage) und doppelt so hohen Krankenhauskosten (\$21577 versus \$11668) verglichen mit einer MSSA-Bakteriämie. Außerdem besteht bei MRSA-Patienten ein größeres Risiko einer verzögerten angemessenen Behandlung und damit steigt auch das Mortalitätsrisiko an [LODISE und McKINNON, 2005].

Mulvey und Simor konnten zeigen, dass die Methicillin-Resistenz bei Patienten mit einer *S. aureus*-Bakteriämie zu einem signifikanten Anstieg der Mortalität führt, das Risiko ist hierbei fast doppelt so hoch (odds ratio 1.93, 95% CI 1.54-2.42) [MULVEY und SIMOR, 2009].

Bei Patienten mit einer VRE-Infektion gibt es ähnliche Ergebnisse. Eine Fall-Kontroll-Studie von Carmeli et al. konnte nachweisen, dass bei Patienten mit VRE im Vergleich zu Patienten, die nicht mit VRE besiedelt sind, die Mortalität (17% vs 6%), operative Eingriffe (18% vs 10%) sowie die Verlegung auf die

Intensivstation (25% vs 14%) signifikant erhöht sind; dadurch steigen auch die Behandlungskosten bei VRE-besiedelten Patienten (US \$ 52449 vs US \$ 31915) [CARMELI und MOZAFFARI, 2002].

In einer anderen Studie von Sohn et al. 2012 wurde die Dauer der Kolonisierung und die Risikofaktoren von VRE-Trägern nach einem Krankenhausaufenthalt untersucht. 75,6% der insgesamt 127 Patienten zeigten 4,86 Wochen (Median) nach der Entlassung aus dem Krankenhaus die ersten VRE-negativen Ergebnisse. Faktoren wie die Einnahme von Antibiotika, Arzttermine, Dialyse oder die Aufnahme in ein Pflegeheim oder eine andere Gesundheitseinrichtung sind unabhängig voneinander assoziiert mit einer verlängerten Kolonisierung mit VRE. Patienten mit diesen Risikofaktoren sollten besonders beobachtet werden um eine Verbreitung von VRE einzudämmen [SOHN et al., 2012].

Ähnliche Studien gibt es auch zu ESBL-bildenden *E. coli*. Die Mortalitätsrate bei Patienten mit einer ESBL-bildenden *E. coli*-Infektion war mit 60,8% signifikant höher, verglichen mit einer nicht-ESBL-bildenden *E. coli*-Infektionen (23,7%). Ein verzögerter Beginn der angemessenen Antibiotikatherapie war signifikant assoziiert mit ESBL-Produktion und Todesfall [MELZER und PETERSEN, 2007].

Gründe für das Resistenzproblem in der Humanmedizin und somit für die gesundheitlichen Auswirkungen sind der Einsatz von Antibiotika mit breitem Wirkungsspektrum, zu langer prophylaktischer Einsatz nach Operationen, sowie die Verwendung bei Kolonisierung und keiner Infektion, oder für die Therapie von viralen Infektionen. Besonders in Krankenhäusern kommen gehäuft multiresistente Keime vor. Durch intensive und langanhaltende Antibiotikatherapie, immunsupprimierte Patienten und die potentielle Übertragung von Patient zu Patient können diese multiresistenten Keime Infektionen auslösen. Eine Gefahr stellt auch die Transmission von Resistenzgenen durch den horizontalen Gentransfer von fakultativ pathogene auf obligat pathogene Keime dar [BMG, 2011]. Im Darm wird die Übertragung von Resistenzgenen von nicht-pathogene auf pathogene Bakterien oder auf opportunistische Bakterien möglich. Lebensmittel

stellen somit einen Weg der Aufnahme pathogener Keime und antibiotikaresistenter Bakterien dar [PESAVENTO et al., 2007].

4.2 Resistenzraten im europäischen Vergleich

Es wurden Überwachungssysteme erstellt um die Verbreitung von antimikrobiellen Resistenzen zu erfassen und Maßnahmen zur Eindämmung der Verbreitung einzuführen. Das „Europäische System zur Überwachung von Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe“ („European Antimicrobial Resistance Surveillance Network“ EARS-Net) ist ein Programm, das normierte, repräsentative und vergleichbare Daten sammelt. Österreich nimmt seit Beginn des Projektes 1998 an der Sammlung der Resistenzdaten teil. Seit 2010 sind 40 Laboratorien, die die Proben von 90% der Krankenanstalten untersuchen, beteiligt. In Europa sind 28 Staaten und mehr als 900 Laboratorien im Netzwerk integriert. Leitfäden und Protokolle für den Nachweis von Resistenzen sowie Ringversuche dienen der Qualitätssicherung.

Die EARS-Net Daten zu MRSA-Raten zeigen, dass sich Österreich im internationalen Vergleich im unteren Drittel befindet (7,4% MRSA-Rate gemessen an der Gesamtanzahl an *S.aureus*-Bakteriämien). Die höchste MRSA-Rate hat Zypern mit 57,3%, die niedrigste Norwegen mit 0,3%. In der Abbildung 4 ist der Vergleich der MRSA-Raten von 2007 zu 2011 ersichtlich [BMG, 2012; ECDC, 2005-2013].

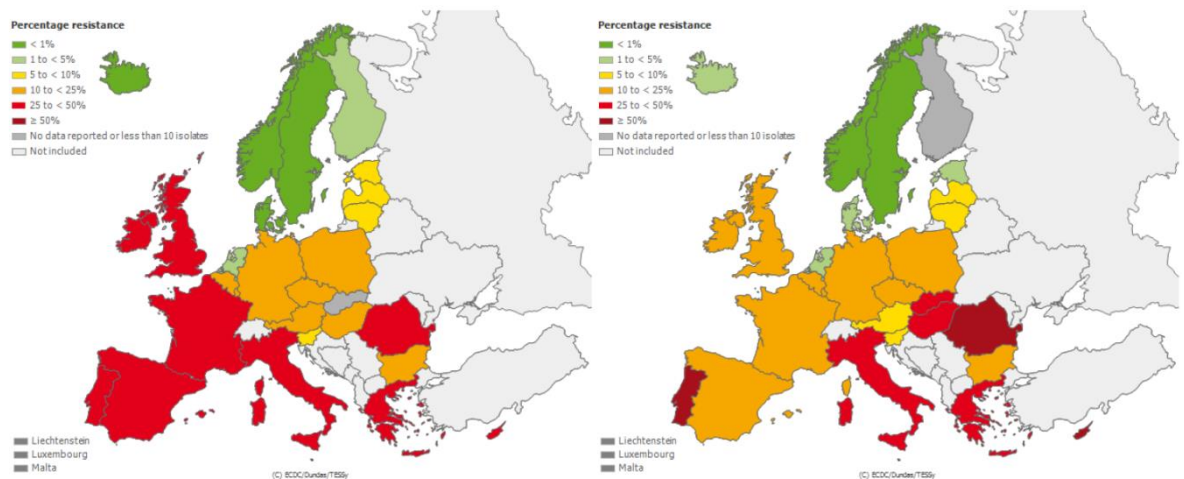


Abbildung 4: MRSA-Raten im internationalen Vergleich 2007 und 2011

[BMG, 2012]

Während sich die MRSA-Rate von 2007 auf 2011 in einigen Ländern, wie zum Beispiel Spanien, Frankreich, Großbritannien und Irland, verringerte, stieg sie in Zypern, Portugal und Rumänien auf über 50% an. Malta war 2007 das einzige europäische Land mit einer Rate über 50% (52,4%); bis 2011 sank die Rate leicht ab auf 49,6%. Die Situation in Österreich verbesserte sich und sank von 10,6% auf 7,4% im Jahr 2011. Norwegen, Schweden, Island und Dänemark hatten 2007 eine MRSA-Rate unter 1%, 2011 waren es nur noch Norwegen und Schweden.

Bei *E. coli* liegt die Resistenzrate gegenüber Aminopenicillinen (Ampicillin, Amoxicillin) bei 50,3% im Jahr 2011. In den letzten Jahren konnte eine leichte Abnahme der Resistenzrate beobachtet werden; 2007 lag die Rate bei knapp 53%. Österreich liegt im europäischen Vergleich in der unteren Hälfte, an der Spitze ist Zypern mit 75,4%, am Ende Schweden mit 34,8%. Die Abbildung 5 verdeutlicht die hohen Resistenzraten in Europa [BMG, 2012].

Der Anteil an ESBL-bildenden *E. coli* an Gesamtisolaten liegt im Jahr 2007 bei 13,3%, im Jahr 2011 bei 11,8%. Der Anteil an ESBL-bildenden *K. pneumoniae* liegt bei 13,3%, mit zunehmenden Trend seit 2009 (8,4%). *K. pneumoniae* zählt nach *E. coli* zu den häufigsten gramnegativen Erregern von Bakteriämien [BMG, 2012].

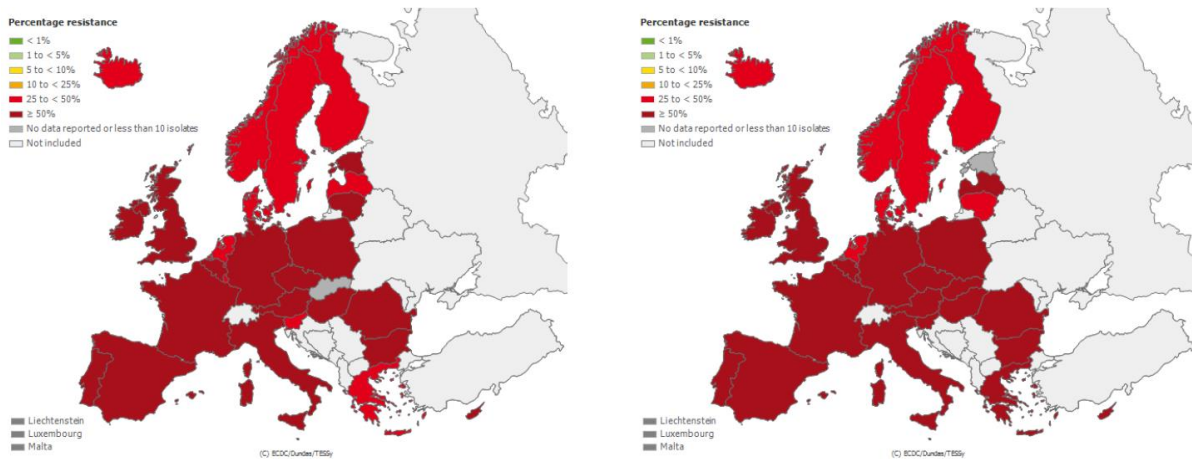


Abbildung 5: Aminopenicilline-Resistenzraten von *Escherichia coli* im europäischen Vergleich 2007 und 2011 [BMG, 2012]

Alle teilnehmenden europäischen Länder haben eine Resistenzrate von über 25%, wobei die Rate von 2007 bis 2011 noch anstieg. 2011 wiesen nur noch Schweden, Finnland und Norwegen eine Rate unter 40% auf (34,8%, 37,3%, 39,1%); Litauen, Dänemark, Island und Niederlande unter 50% auf (47,8%, 47,9%, 48,1%, 48,5%).

Die Rate von Vancomycin-resistenten Enterokokken ist in Österreich in den letzten Jahren angestiegen; 2007 lag die Resistenzrate bei 1,9% (*E. faecium*) bzw. bei 0,5% (*E. faecalis*) und stieg auf 4,4% bzw. 0,7% an. Im europäischen Vergleich liegt Österreich bei Vancomycin-resistenten *E. faecalis* im oberen Drittel. Während Griechenland die höchste Rate mit 6,2% besitzt, zeigen 14 von 29 europäischen Ländern kein Vorkommen von resistenten *E. faecalis*. Bei den Vancomycin-resistenten *E. faecium* reicht die Spanne von 34,9% in der Republik Irland bis 0% in 8 von 29 Staaten [BMG, 2012].

In der Abbildung 6 ist die Veränderung der Prävalenz von Vancomycin-resistenten *E. faecium* von 2005 bis 2011 erkennbar [ECDC, 2005-2013].

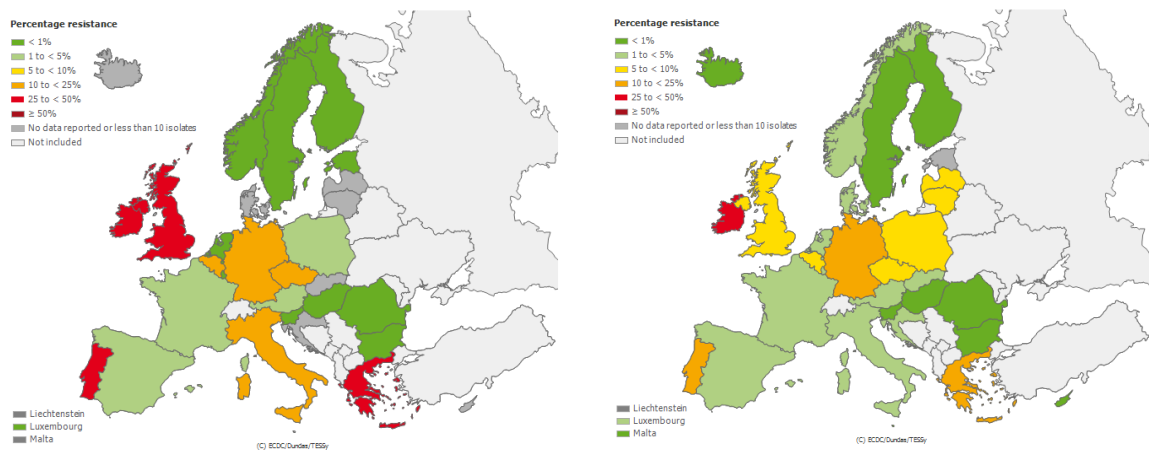


Abbildung 6: Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* im europäischen Vergleich 2005 und 2011 [ECDC, 2005-2013]

Irland, Großbritannien, Portugal und Griechenland wiesen 2005 eine Resistenzrate von über 25% auf (30,9%, 33,0%, 33,7%, 37,0%). Bis 2011 sanken die Resistenzraten auf 8,9% in Großbritannien, 20,2% in Portugal und 23,1% in Griechenland. In Irland stieg die Rate auf 34,9% an. In Österreich stieg die Resistenzrate von 1,2% in 2005 auf 4,5% in 2011.

5 LEBENSMITTEL ALS VEHIKEL BEI DER ÜBERTRAGUNG VON ANTIBIOTIKARESISTENTEN BAKTERIEN

Lebensmittel und Wasser stellen die bedeutendsten Vektoren bei der Übertragung von Bakterien auf die menschliche Intestinalflora dar. Trotz der hohen Hygienestandards in den Industrieländern kann eine fäkale Kontamination von Fleischprodukten nicht restlos vermieden werden [WITTE, 2000]. Im Darm wird die Übertragung von Resistenzgenen von nicht-pathogene auf pathogene Bakterien oder auf opportunistische Bakterien möglich. Lebensmittel stellen somit einen Weg der Aufnahme pathogener Keime und antibiotikaresistenter Bakterien dar [PESAVENTO et al., 2007].

Der Einsatz von Antibiotika führt zum Auftreten von resistenten Bakterien im Darm der Nutztiere, die während der Schlachtung auf das Fleisch und somit in die Lebensmittelkette gelangen können. So sind besonders Lebensmittel tierischen Ursprungs mit antibiotikasensiblen, als auch –resistenten Bakterien kontaminiert und stellen die Hauptroute für die Transmission von resistenten Bakterien und Resistenzgenen dar. Einfluss hat auch der direkte Kontakt mit Tieren bzw. deren Umwelt. Pflanzliche Lebensmittel können durch tierische Ausscheidungen (Gülle) und Wasser kontaminiert werden und somit auch einen Transmissionsweg darstellen. Somit ist laut WHO die Antibiotikaresistenz eine Herausforderung in der Lebensmittelsicherheit [WHO, 2011].

Die Reservoirs sowie die Transmissionswege von antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgenen sind in der Abbildung 7 dargestellt.

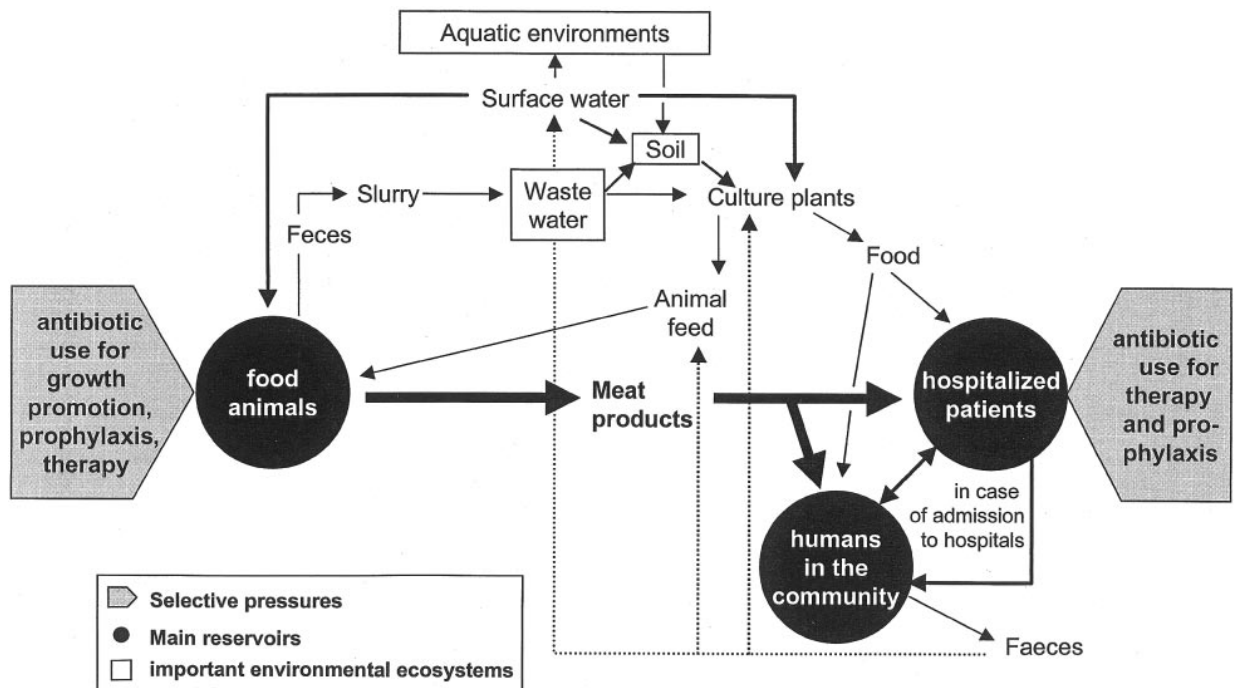


Abbildung 7: Routen der Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgenen [WITTE, 2000]

Durch den Gebrauch von Antibiotika bei Menschen und Tieren entsteht ein Druck, der resistente Bakterien selektiert. Die dadurch entstehenden Hauptreservoirs werden von Nutztieren und Menschen in Krankenhäusern als auch in der Gemeinschaft dargestellt. Die Übertragung von resistenten Bakterien von Tier auf den Menschen erfolgt über Lebensmittelprodukte und indirekt über fäkale Kontamination von Wasser und Pflanzen. Die Übertragung von Mensch auf Tier erfolgt indirekt über kontaminierte Futtermittel und Ab- bzw. Oberflächenwasser.

Antibiotikaresistente Bakterien können durch den Verzehr von tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln in den menschlichen Körper gelangen. Durch das Erhitzen von Fleisch werden Mikroorganismen abgetötet. Wenn das Fleisch unzureichend erhitzt wird, bleiben die Bakterien aktiv. Besondere Bedeutung nimmt hier vor allem faschiertes Fleisch (Burger, Würstchen) ein, da nicht nur die Oberfläche kontaminiert sein kann, sondern auch das Innere. Wenn das faschierte Fleisch nicht vollständig durchgegart wird, werden die antibiotikaresistenten Bakterien nicht inaktiviert. Neben der Erhitzung spielt auch die Übertragung von Fleisch auf Gemüse während der Zubereitung eine wesentliche

Rolle. Diese sogenannte Kreuz-Kontamination kann durch die Hände und/oder das Schneidbrett erfolgen. Durch die Zubereitung von rohem Fleisch können Bakterien auf die Hände gelangen. Werden diese nicht gewaschen und anschließend Gemüse zubereitet, besteht die Möglichkeit, dass die Bakterien vom rohen Fleisch über die Hände auf das Gemüse gelangen. Ebenso gelangen Bakterien vom Fleisch auf das Schneidbrett. Wird dieses nicht gewaschen oder ausgetauscht, können Bakterien vom Schneidbrett auf das Gemüse geraten [DEPOORTER et al., 2012].

Resistente Bakterien können über Lebensmittel übertragen werden. Fleischprodukte spielen beispielsweise eine Rolle bei der Übertragung von Resistenzgen-tragenden *E. coli* und von Enterokokken mit *vanA*-vermittelter Glykopeptidresistenz [WITTE, 2000]. Lebensmittel können auch mit Bakterien, die ESBL-Gene tragen, kontaminiert sein. Diese ESBL-Gene sind auf Plasmiden lokalisiert, und somit ist die Transmission auf Pathogene im menschlichen Verdauungstrakt möglich. Mögliche Beiträge zur zunehmenden Inzidenz von Infektionen mit ESBL-bildenden Erregern sind zum einen, dass Nutztiere ESBL-bildende Bakterien in sich tragen und zum anderen, dass Fleisch mit diesen Bakterien kontaminiert sein kann. In den Niederlanden wurde eine Studie durchgeführt, die ESBL-Gene, Plasmide und Bakterienstämme von Geflügel, Hühnerfleisch und Menschen verglichen. Bei 35% der *E. coli*-Isolaten vom Menschen konnten ESBL-Gene nachgewiesen werden; 19% davon waren auf Plasmiden lokalisiert und genetisch nicht von Geflügel-Isolaten zu unterscheiden. Der Großteil (86%) der menschlichen *E. coli* enthielt die Gene *bla*_{CTX-M-1} oder *bla*_{TEM-52}. Diese überwiegen auch in Geflügelproben (77%) und Hühnerfleischproben (75%). Von den Hühnerfleischproben waren 94% mit ESBL-positiven *E. coli* kontaminiert, 39% davon waren genetisch ident mit *E.coli*-Isolaten vom Menschen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Übertragung von Bakterien mit ESBL-Produktion von Geflügel auf den Menschen, hauptsächlich über die Lebensmittelkette, hin. Es sei noch zu erwähnen, dass der Antibiotikaeinsatz in der Geflügelindustrie in den Niederlanden europaweit am höchsten ist [LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2011].

Im Jahr 2009 wurden im Rahmen des Zoonosen-Monitoring Fleischproben auf MRSA und ESBL-bildende Enterobakterien untersucht, dabei waren 22,3 % der Hähnchenfleischproben, 42,2 % der Putenfleischproben, 15,8 % der Schweinefleischproben und 12,9 % der Kalbfleischproben mit MRSA belastet. ESBL-bildende *E. coli* und Salmonellen konnten in 5-6 % der Hähnchenfleischproben nachgewiesen werden. Diese Bakterien stammen aus der Viehhaltung und können bei der Schlachtung auf das Fleisch gelangen [KLEES, 2012].

Die Verbreitung von Resistenzgenen in der aquatischen Umwelt spielt hauptsächlich dort eine Rolle, wo eine hohe Dichte von Mikroorganismen vorherrscht. Diese sogenannten Biofilme findet man in Kläranlagen sowie in Oberflächengewässer und auch in Trinkwassersystemen [SCHWARTZ et al., 2003]. In Seewasser und Abwasserkläranlagen konnten große Mengen an antibiotikaresistenten Enterobakterien nachgewiesen werden. Durch die prophylaktische und therapeutische Einnahme von Antibiotika werden diese letztendlich ausgeschieden und gelangen ins Abwasser. Die gemessenen Konzentrationen sind weit unter der MHK. Die Bewässerung mit Abwasser oder Oberflächenwasser kann eine Übertragung von resistenten Bakterien auf Pflanzen, vor allem Gemüse, zur Folge haben. So gelangen Enterobakterien auch in die Erde. Sie kommen natürlich zwar im Darm von Menschen und Tieren vor, können jedoch auch in der Erde überleben [WITTE, 2000]. Faria et al. untersuchten Wasserproben von Trinkwasseraufbereitungssystemen, Verteilungssystemen und Abwassersystemen in Portugal. *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus saprophyticus* waren die am häufigsten vorkommenden Koagulase-negativen Staphylokokken; sie konnten in allen Wassertypen nachgewiesen werden. Der Großteil der isolierten Staphylokokken wies eine Resistenz gegen Erythromycin auf, außerdem konnten Resistenzen gegen β -Laktame, Tetracycline und Clindamycin beobachtet werden [FARIA et al., 2009]. Antibiotikaresistente Bakterien konnten auch in privaten Trinkwasserquellen gefunden werden. *Escherichia coli* wurden aus Wasserproben von privaten Haushalten isolierten, davon waren 10,5% resistent gegen Tetracycline,

Sulfonamide, β -Laktame, Aminoglykoside, Chloramphenicol oder Quinolone [COLEMAN et al., 2013].

Eine indirekte Gefahr geht durch die Möglichkeit des horizontalen Gentransfers aus, wodurch Resistenzgene auf für den Menschen pathogene Bakterien übertragen werden können [WHO, 2011]. Der bedeutendste Mechanismus der Resistenzübertragung ist die Konjugation. (siehe Kapitel 1.2.2 Resistenztransfer). Die Resistenzübertragung mittels Konjugation konnte in einigen experimentellen Studien nachgewiesen werden. Walsh et al. konnten die Ampicillin-Resistenz-Übertragung von *Salmonella typhimurium* DT104 auf *Escherichia coli* K12 in Milch und Rinderhackfleisch beobachten [WALSH et al., 2008].

Toomey et al. untersuchten die Übertragung von Antibiotikaresistenzen von Milchsäurebakterien auf potentielle Lebensmittel-Pathogene. Als Milchsäurebakterien wurden *Lactococcus lactis* und *Enterococcus faecalis* mit Erythromycin- oder Tetrazyklin-Resistenz verwendet, und einer mit pathogenen Stämmen (*Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, *S. aureus* und *E. coli*) kontaminierten Milch zugesetzt. Eine Übertragung der Resistenzen konnte auf *Listeria spp.* und innerhalb der Milchsäurebakterien jedoch nicht auf *S. aureus*, *E. coli* oder *Salmonella spp.* beobachtet werden [TOOMEY et al., 2009].

Den Mechanismus der Transformation konnte bei *Bacillus subtilis* in Milch nachgewiesen werden. Das Kanamycin-Resistenzgen von der chromosomalen DNA von *E. coli* diente als Marker des horizontalen Gentransfers [KHARAZMI et al., 2002].

Mikroorganismen werden oft bewusst aus lebensmitteltechnologischen Gründen in der Lebensmittelproduktion eingesetzt. Milchsäurebakterien werden als Starterkulturen den Lebensmitteln zugesetzt um den Beginn der Fermentation einzuleiten. Solche Starterkulturen werden bei der Herstellung von fermentierten Lebensmitteln und Getränken verwendet, wie zum Beispiel Joghurt, Käse, Sauerkraut und fermentierte Würste. Ein weiterer Grund für den Einsatz von Mikroorganismen ist die Konservierung. Die verwendeten Bakterien produzieren antimikrobielle Substanzen oder/und konkurrieren um Nährstoffe, somit werden

Verderbniserreger gehemmt/inaktiviert und die Haltbarkeit des Lebensmittels verlängert. Mikroorganismen werden auch als Probiotika Lebensmitteln zugesetzt. Sie sollen einen positiven Effekt auf den Konsumenten haben. Milchsäurebakterien und Bifidobakterien sind die dabei am meisten verwendeten. Die Mikroorganismen, die in der Lebensmittelproduktion verwendet werden, können Antibiotikaresistenzen tragen. Durch die Nahrungsaufnahme gelangen diese Bakterien in den menschlichen Verdauungstrakt, wo die Übertragung von Genen stattfinden kann. Probiotika können durch das Anheften an die intestinalen Darmzellen den Darm für eine längere Zeit als andere Bakterien besiedeln. Dadurch und durch den vermehrten Konsum von probiotischen Lebensmitteln steigt das Risiko des Transfers von Resistenzgenen [VERRAES et al., 2013]. Um sicherzustellen, dass die in der Lebensmitteltechnologie eingesetzten Mikroorganismen keine übertragbaren Resistenzgene besitzen, gibt es in der EU das Konzept der Qualifizierten Sicherheitsannahme (Qualified Presumption of Safety, QPS). Es enthält eine Liste mit als sicher bewertete Mikroorganismen [EFSA, 2007].

Lebensmittelverarbeitungs- und Konservierungsmethoden dienen der Verlängerung der Haltbarkeit. Je nach Techniken können Bakterien überleben mit oder ohne Hemmung des Wachstums. Wenn die Vermehrung gehemmt wird, sind die Bakterienzellen gestresst oder sub-letal geschädigt. Die Bakterien können aber auch abgetötet werden, die Zellen können intakt oder lysiert sein durch Zellwandschäden. Die DNA und eventuell auch Resistenzgene werden freigesetzt und gelangen in die Umwelt. Durch die Aufnahme von freier DNA mit Resistenzgenen (Transformation, siehe Kapitel 1.2.2 Resistenztransfer) können Bakterien Antibiotikaresistenzen entwickeln. Dieser Mechanismus des Resistenztransfers ist jedoch seltener als die Konjugation und unterliegt einer Vielzahl von Voraussetzungen. So ist etwa die DNA empfindlich gegenüber DNA-Nuclease und physikalischen und chemischen Einflüssen [VERRAES et al., 2013].

Bakteriophagen können in der Lebensmitteltechnologie zur Inaktivierung von lebensmittelpathogenen Bakterien und Verderbniserregern verwendet werden, zum Beispiel zum Inaktivieren von *Listeria monocytogenes* in Weichkäse [CARLTON et al., 2005] und von *Salmonella enterica* und *Campylobacter jejuni* nach Kontamination von Hühnerhaut [GOODE et al., 2003]. Bakteriophagen in der Umwelt können ein Reservoir für Resistenzgene darstellen. Colomer-Lluch et al. untersuchten Abwasser und Flusswasser auf das Vorhandensein von Resistenzgen-tragenden Bakteriophagen. In allen DNA-Proben von Bakteriophagen konnten entweder β -Lactamase-Gene (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M9}) oder das *mecA*-Gen nachgewiesen werden. Diese Gene sind verantwortlich für die Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika. Zusätzlich konnten die *bla*-Gene auf *E. coli* übertragen werden, die dadurch eine Ampicillin-Resistenz entwickelten [COLOMER-LLUCH et al., 2011].

Das Risiko der Aufnahme von Resistenzgen-tragenden Bakteriophagen durch den Verzehr von Lebensmitteln ist in der EU sehr gering, da innerhalb der EU der Einsatz von Bakteriophagen nicht erlaubt ist. In den USA hingegen werden Bakteriophagen zur Inaktivierung von *Listeria monozytogenes* eingesetzt [VERRAES et al., 2013].

In der Abbildung 8 werden die besprochenen Möglichkeiten der Übertragung von Genen und somit auch Resistenzgenen in Lebensmitteln zusammengefasst.

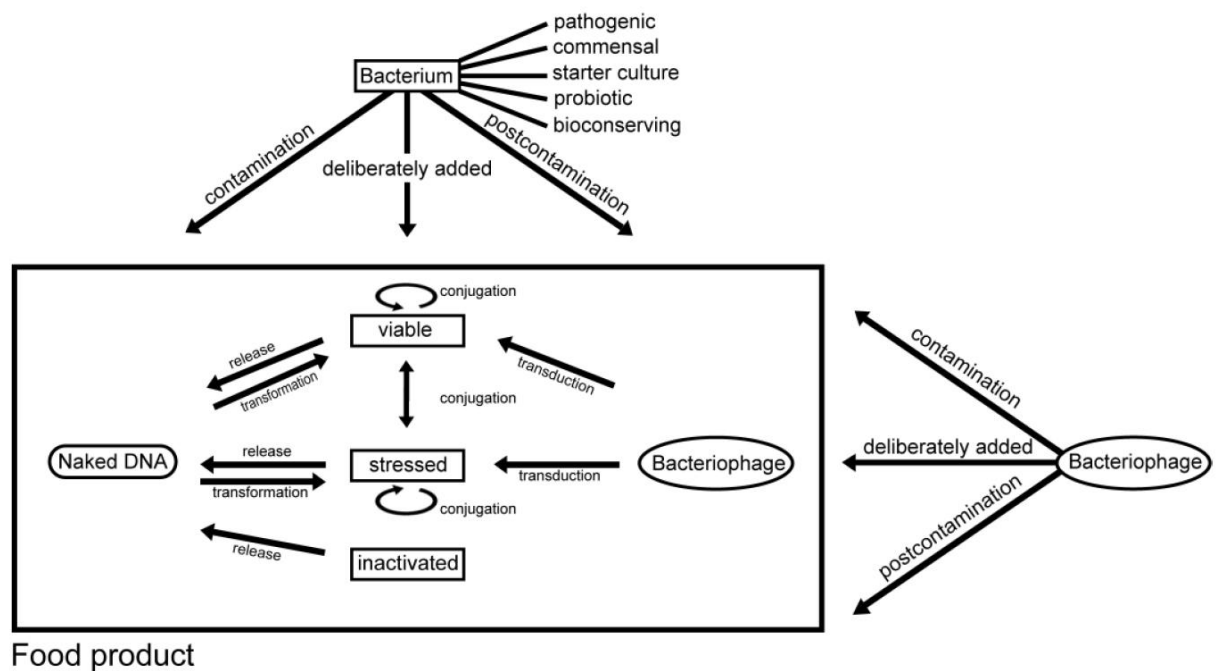


Abbildung 8: Horizontaler Gentransfer in Lebensmitteln
[VERRAES et al., 2013]

Bakterien und Bakteriophagen können durch Kontamination während der Schlachtung, durch Umwelteinflüsse, sogenannte Postkontamination, oder durch bewusstes Hinzufügen ins Lebensmittel gelangen. Werden diese inaktiviert, kommt es zur Freisetzung von nackter DNA, die durch Transformation von lebensfähigen oder gestressten Bakterienzellen aufgenommen werden kann. Zwischen und innerhalb von lebensfähigen und gestressten Bakterien erfolgt die Übertragung mittels Konjugation. Bakteriophagen übertragen Gene auf lebensfähige und gestresste Bakterien mittels Transduktion.

Unverarbeitete Lebensmittel wie frisches Obst und Gemüse können Bakterien mit Resistenzgenen enthalten. Durch die fehlende Verarbeitung sind die Bakterienzellen intakt und können durch Konjugation Resistenzgene im Lebensmittel und im Verdauungstrakt des Menschen mit anderen Bakterien austauschen [VERRAES et al., 2013].

Ruimy et al. untersuchten rohes Obst und Gemüse auf das Vorkommen von resistenten gramnegativen Bakterien. 49,9% der Proben enthielten Oxidase-negative gramnegative Bakterien, die resistent gegen Cephalosporine der

3. Generation sind. Es konnten *Acinetobacter* (70,8%), *Stenotrophomonas* (6,8%), *Rahnella* (17%) sowie *Proteus*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Ewingella*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Serratia* und *Enterobacter* identifiziert werden. 13% der untersuchten Lebensmittel enthielten ESBL-bildende *Rahnella* sp.. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen konventionellen und biologischen Lebensmitteln [RUIMY et al., 2010].

Schwaiger et al. untersuchten Gemüse von Bauernhöfen und Supermärkten in Deutschland auf das Vorhandensein resistenter Bakterien. 861 resistente Isolate (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Enterococcus faecalis*) wurden aus 1001 Gemüseproben isoliert und deren Empfindlichkeit gegenüber 30 Antibiotika getestet. 41% der *P. agglomerans*-Isolate und 29% der *E. gergoviae*-Isolate wiesen eine Resistenz gegen β -Lactame auf. *E. faecalis* waren resistent gegen Doxycyclin (23%), Erythromycin (21%) und Rifampicin (65%). *E. cloacae* wiesen eine Resistenz gegen Spectinomycin (28%) und Mezlocillin (12%). Die Proben von den Bauernhöfen wiesen eine höhere Resistenzrate im Vergleich zu den Proben aus den Supermärkten auf [SCHWAIGER et al., 2011].

Durch Hitzebehandlung können antibiotikaresistente Bakterien abgetötet werden, jedoch sind Antibiotikarückstände relativ hitzestabil. Quinolone in Milch werden maximal zu 12,7% bei Ciprofloxacin und 12,01% bei Norfloxacin durch eine Erhitzung auf 120°C für 20 Minuten inaktiviert. Sie sind somit sehr stabil gegenüber Hitzebehandlung und können ein Gesundheitsrisiko darstellen [ROCA et al., 2010].

Antibiotikaresistenzgene können demnach während der Lebensmittelherstellung und -verarbeitung sowie nach Nahrungsaufnahme im menschlichen Verdauungstrakt auf pathogene Erreger übertragen werden. Das Vorkommen von resistenten kommensalen Bakterien in Nutztieren und Lebensmitteln sollte reduziert werden. Die Untersuchung von mobilen Gen-Abschnitten kann einen

Beitrag zum Verständnis der Epidemiologie leisten, wodurch Maßnahmen zur Überwachung und Reduktion abgeleitet werden könnten. Ebenso sollte die Transmission von Resistenzgenen durch die Mechanismen des horizontalen Gentransfers und die Bedeutung von Lebensmitteln weiter erforscht werden [VERRAES et al., 2013].

Aufgrund der direkten Übertragbarkeit von Tier auf Mensch über Fleischprodukte, wurden in dieser Studie die Prävalenzen von antibiotikaresistenten Bakterien in Frischfleisch untersucht. Zum Vergleich wurden Proben von Rind, Kalb, Schwein, Huhn und Pute herangezogen. Der Schwerpunkt liegt am Nachweis von Methicillin-resistenten Staphylokokken, ESBL-bildenden Enterobacteriaceae und Vancomycin-resistenten Enterokokken. Im zweiten Schritt wurde die Empfindlichkeit gegenüber weiteren Antibiotika getestet und das Vorkommen von Multiresistenzen ermittelt.

III. MATERIAL UND METHODEN

Die Ziele dieser Studie sind die Prävalenz von Methicillin-resistenten Staphylokokken, extended-spectrum- β -Lactamase (ESBL)-bildenden Enterobacteriaceae und Vancomycin-resistenten Enterokokken in Frischfleisch von Rind, Kalb, Schwein, Faschiertes gemischt, Huhn und Pute sowie das Ausmaß an Multiresistenz zu ermitteln.

1 PROBEN UND NÄHRMEDIEN

Insgesamt wurden 100 Fleisch- und Geflügelproben im Zeitraum von April 2013 bis Juni 2013 von Lebensmittelgeschäften, Metzgern und Lebensmittelmärkten in Wien gesammelt. Es handelt sich um rohes Frischfleisch von Rind (22%), Schwein (20%), Schwein und Rind gemischt (10%), Kalb (8%), Huhn (30%) und Pute (10%) im Stück oder faschiert ohne Zusätze oder Gewürze. Die mikrobiologische Analyse erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach dem Kauf, währenddessen wurden die Proben bei 4 ± 1 °C gelagert.

Zum Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien wurden die chromogenen Selektivmedien chromID MRSA (bioMérieux, Frankreich), chromID ESBL (bioMérieux, Frankreich) und chromID VRE (bioMérieux, Frankreich) verwendet.

ChromID MRSA dient der Identifizierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* und enthält das Antibiotikum Cefoxitin. MRSA werden sichtbar durch eine Grünfärbung bedingt durch α -Glucosidase-Aktivität.

ChromID ESBL-Agarplatten enthalten eine Antibiotikamischung mit Cefpodoxim. Dieses Antibiotikum gilt als Marker für diesen Mechanismus der Resistenz. ESBL-bildende *Escherichia coli* färben sich durch die Aktivität von β -Glucuronidase rosa bis dunkelrot, ESBL-bildende *Klebsiella*-, *Enterobacter*-, *Serratia*- und *Citrobacter*-Stämme färben sich durch β -Glucosidase-Aktivität

grün/blau bis braun/grün. Eine dunkel- bis hellbraune Färbung deutet auf *Proteeae* hin.

ChromID VRE-Agarplatten enthalten das Antibiotikum Vancomycin (8 mg/l) und die zwei chromogenen Substrate α -Glucosidase und β -Galactosidase. Vancomycin-resistente *E. faecalis*-Kolonien färben sich somit blau-grün, resistente *E. faecium*-Kolonien färben sich violett.

Charakteristisch gefärbte *S. aureus*, *E. coli* und *K. pneumoniae* sind in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

Um den Anteil von antibiotikaresistenten zu antibiotikasensitiven Bakterien zu ermitteln, wurden Columbia Agar mit 5% Hammelblut (bioMérieux, Frankreich) zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl, Baird Parker (BP; Merck, Deutschland) zur Bestimmung von *S. aureus* durch eine doppelte Aufhellung des Agars (ohne weitere Identifikation), Chromocult-Agar (CCA; Merck, Deutschland) zur Bestimmung von *E. coli* und coliforme Bakterien und Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (KANA; Merck, Deutschland) zur Bestimmung von Enterokokken verwendet.



Abbildung 9: Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* auf chromID MRSA (BioMérieux) [Eigene Aufnahme, am 10.05.2013]

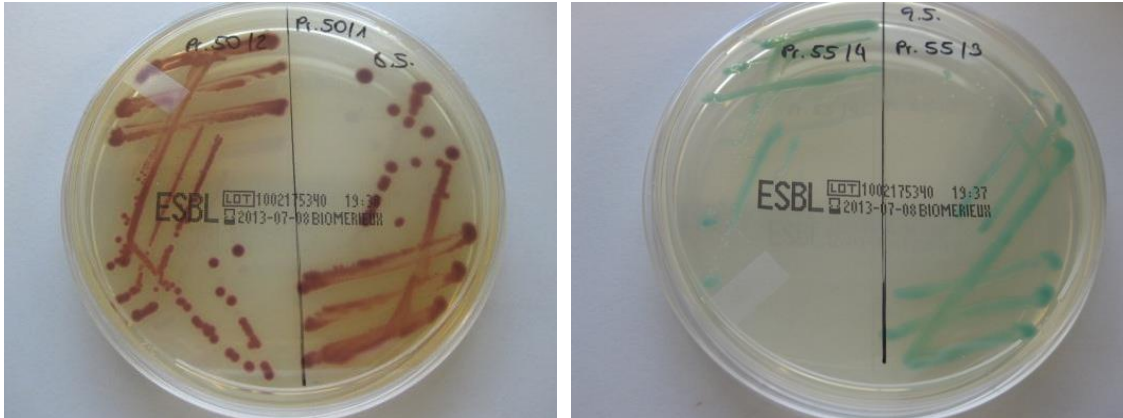


Abbildung 10: ESBL-bildende *Escherichia coli* (links) und ESBL-bildende *Klebsiella pneumoniae* (rechts) auf chromID ESBL (BioMérieux)

[Eigene Aufnahme, am 10.05.2013]

2 BAKTERIELLE ISOLIERUNG, IDENTIFIZIERUNG UND ANTI-MIKROBIELLE EMPFINDLICHKEITSTESTS

Zur Isolierung wurden 25g Probe mit 225ml Pepton (Merck, Deutschland) für 2 Minuten homogenisiert. Insgesamt wurden 4 Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:1000) erstellt. 1 mL jeder Verdünnungsstufe wurde auf Columbia-Agar, CCA, BP und KANA pipettiert, ausgespaltet und entsprechend inkubiert (37°C, 1d; 37°C, 1d; 37°C, 2d; 44°C, 1d). Auf chromID MRSA, chromID ESBL und chromID VRE wurde 1mL der 1:10 Verdünnung aufgetragen und bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Bei einem negativen Ergebnis auf chromID VRE bei gleichzeitigem Enterokokken-Wachstum auf KANA, wurde die Inkubierung auf 48 Stunden verlängert.

Zur Identifizierung von charakteristisch gefärbten Kolonien erfolgte eine Gram-Färbung, Oxidase-Test/Katalase-Test und Koagulase-Test sowie API 20E/ API Staph/ API Strep.

Zur Resistenzbestimmung wurde die Agardiffusionsmethode nach Kirby-Bauer auf Müller-Hinton Agar (Merck, Deutschland) durchgeführt. Die Isolate wurden gegen folgende Antibiotika getestet: Erythromycin 15µg, Azithromycin 15µg, Ciprofloxacin 5µg, Doxycyclin 30µg, Teicoplanin 30 µg, Ampicillin 10 µg,

Tetracyclin 30µg, Norfloxacin 10µg, Kanamycin 30µg, Gentamycin 10µg, Streptomycin 10µg, Vancomycin 30µg, Penicillin G 10units, Clindamycin 2µg, Cephazolin 30 µg, Cefoxitin 30µg (Oxoid, England).

Die Hemmhöfe wurden nach den Guidelines des Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI, 2011] interpretiert.

Enterobakterien besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber den Antibiotika Erythromycin, Azithromycin, Teicoplanin, Penicillin G, Clindamycin und Vancomycin. Diese Antibiotika wurden bei der Auswertung des Antibiotogramms und bei der Bestimmung der Multiresistenz nicht beachtet.

Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS für Windows 15.0. Ein p-value von <0,05 gilt als signifikant.

IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Insgesamt wurden 100 Frischfleisch- und Geflügelproben auf das Vorhandensein von Methicillin-resistenten Staphylokokken, ESBL-bildenden Enterobakterien und Vancomycin-resistenten Enterokokken untersucht. Die Proben verteilen sich wie folgt: 22% Rind (54,5% Stück, 45,5% faschiert), 8% Kalb (50% Stück, 50% faschiert), 20% Schwein (60% Stück, 40% faschiert), 10% Gemischt (100% faschiert), 30% Huhn (46,7% Stück, 53,3% Keule mit Haut) und 10% Pute (100% Stück); davon stammten 14% aus biologischer Haltung aufgeteilt auf Rind 3%, Kalb 4%, Schwein 3%, Faschiertes gemischt 1% und Huhn 3%.

56% der Proben wurden auf Lebensmittelmärkten (Brunnenmarkt, Naschmarkt, Meiselmarkt, Meidlinger Markt), 31% in Lebensmittelgeschäften (Spar, Eurospar, Billa, Merkur) und 13% in Metzgereien (Schirnhofer, Radatz, Stierschneider) gesammelt.

Die Gesamtkeimzahl aller Proben lag zwischen $1,4 \times 10^3$ und $3,5 \times 10^7$ KBE/25g. Die durchschnittliche Anzahl an coliforme Bakterien lag bei $2,1 \times 10^5$ KBE/25g (min= 10^1 KBE/25g; max= 1×10^7 KBE/25g), die an *E. coli* bei $5,2 \times 10^3$

KBE/25g (min= 0 KBE/25g; max= $1,1 \times 10^5$ KBE/25g). *Staphylococcus aureus* kam durchschnittlich im Ausmaß von 1×10^3 KBE/25g (min= 0 KBE/25g; max= $4,6 \times 10^4$ KBE/25g) und Enterokokken im Ausmaß von $1,2 \times 10^3$ KBE/25g (min= 0 KBE/25g; max= $3,2 \times 10^4$ KBE/25g) vor.

1 PRÄVALENZ VON ANTIBIOTIKARESISTENTEN

BAKTERIEN

1.1 Prävalenz von Methicillin-resistenten Staphylokokken MRS

10 Methicillin-resistente Staphylokokken-Stämme konnten in 8 von 100 (8%) Proben nachgewiesen werden, wobei in zwei dieser Proben zwei resistente Staphylokokken-Stämme (*Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus xylosus*) zu finden waren. Die Verteilung liegt bei 40% (4 von 10) *Staphylococcus sciuri*, 30% (3 von 10) *Staphylococcus aureus*, 20% (2 von 10) *Staphylococcus xylosus* und 10% (1 von 10) *Staphylococcus intermedius*. Die Keimzahl lag zwischen 1×10^1 und $1,3 \times 10^2$ KBE/25g. MRSA kam im Ausmaß von 1×10^1 bis $1,1 \times 10^2$ KBE/25g vor.

Diese Methicillin-resistenten Staphylokokken konnten von Huhn (37,5%, 3 von 8), Pute (25%, 2 von 8), Kalb (12,5%, 1 von 8), Schwein (12,5%, 1 von 8) und Faschiertes gemischt (12,5%, 1 von 8) isoliert werden; in Rindfleischproben konnten keine resistenten Staphylokokken nachgewiesen werden. Die positiv getestete Kalbfleischprobe stammt aus biologischer, die restlichen aus konventioneller Haltung. 7 dieser 8 positiven Proben wurden auf Lebensmittelmärkten gekauft, die andere in einem Lebensmittelgeschäft. Die Prävalenz in Putenfleisch ist höher (20%, 2 von 10) als in Kalbfleisch (12,5%, 1 von 8), Hühnerfleisch (10%, 3 von 30), Faschiertem gemischt (10%, 1 von 10) und Schweinefleisch (5%, 1 von 20). Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0,47$).

Es gibt auch keinen signifikanten Unterschied ($p=0,32$) zwischen MRS-positiven Proben und der Darreichungsform (im Stück oder faschiert).

1.2 Prävalenz von ESBL-bildenden Enterobakterien

Aus 34% der Proben konnten 38 ESBL-bildende Stämme isoliert werden: 42,1% (16 von 38) *Klebsiella pneumoniae sp pneumoniae*, 18,4% (7 von 38) *Escherichia coli*, 7,9% (3 von 38) *Enterobacter cloacae*, 7,9% (3 von 38) *Pantoea spp* 2, 5,3% (2 von 38) *Enterobacter aerogenes*, 5,3% (2 von 38) *Serratia plymuthica* sowie je 2,6% (1 von 38) von *Escherichia vulneris*, *Klebsiella pneumoniae sp ozeanae*, *Serratia rubidaea*, *Ewingella americana* und *Pantoea spp* 3. Alle getesteten Fleisch- und Geflügelarten wiesen ESBL-bildende Bakterien auf: 44,1% (15 von 34) Huhn, 23,5% (8 von 34) Rind, 11,8% (4 von 34) Pute, 8,8% (3 von 34) Kalb, 5,9% (2 von 34) Schwein, 5,9% (2 von 34) Faschiertes gemischt. In 4 der 34 Proben konnten zwei verschiedene ESBL-bildende Bakterien nachgewiesen werden. 6 der 34 positiven Proben (17,6%) stammten aus biologischer Haltung, Kalb (n=3), Rind (n=2), und Huhn (n=1). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen ESBL-positiven Proben und der Fleischsorte ($p=0,085$) beziehungsweise der Darreichungsform ($p=0,33$).

23 der 34 positiven Proben wurden auf Lebensmittelmärkten gekauft, 7 positive Proben in Lebensmittelgeschäften und 4 bei Metzgern.

Die Keimzahl lag zwischen 1×10^1 und 7×10^4 KBE/25g, wobei bei 25 von 38 Isolaten eine Keimzahl unter 8×10^1 KBE/25g vorlag. 5 Isolaten kamen im Ausmaß von über $1,3 \times 10^3$ KBE/25g vor, darunter drei *K. pneumoniae*-Isolate und je ein *E. cloacae*- und *Pantoea spp* 3 –Isolat. Die Anzahl an ESBL-bildenden *E. coli* lag zwischen 1×10^1 und $2,9 \times 10^2$ KBE/25g.

Die Prävalenz ist in Hühnerfleisch am höchsten (50%, 15 von 30) gefolgt von Putenfleisch (40%, 4 von 10), Kalbfleisch (37,5%, 3 von 8), Rindfleisch (36,4%, 8 von 22), Faschiertes gemischt (20%, 2 von 10) und Schweinefleisch (10%, 2 von 20).

1.3 Prävalenz von Vancomycin-resistenten Enterokokken

In 69% der Proben konnten Enterokokken im Ausmaß zwischen 1×10^1 und $3,2 \times 10^4$ KBE/25 g nachgewiesen werden, Vancomycin-resistente Enterokokken konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden.

Die Abbildung 11 gibt einen Überblick über die Verteilung der untersuchten und positiv getesteten Proben auf die Fleisch- und Geflügelarten.

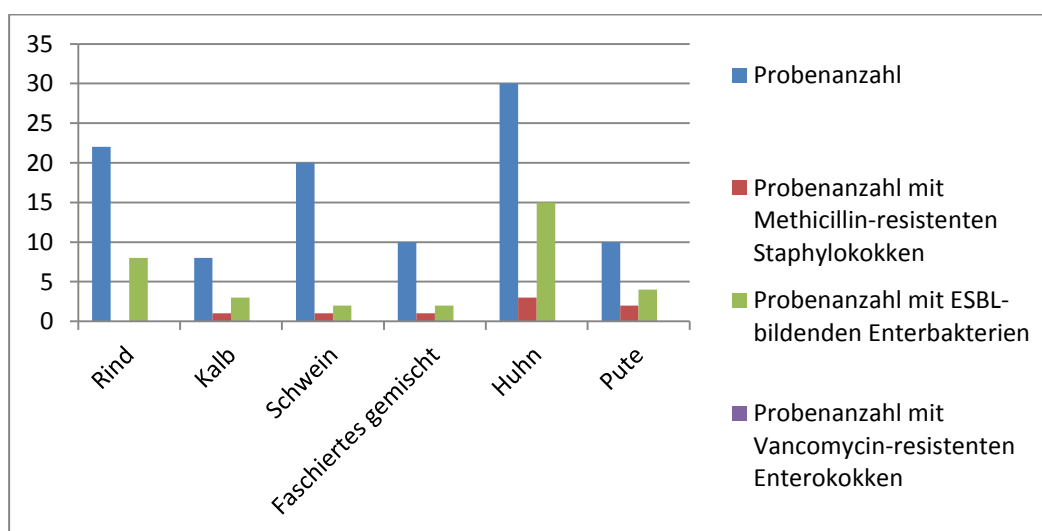


Abbildung 11: Probenanzahl und Proben mit antibiotikaresistenten Bakterien nach Fleischsorte

Die Gesamtanzahl der Proben wird den Proben, die positiv auf MRS, ESBL-bildende Enterobakterien und VRE getestet wurden, gegenübergestellt, unterteilt nach den Fleischsorten Rind, Kalb, Schwein, Faschiertes gemischt, Huhn und Pute.

3% aller Proben (je eine Probe von Kalb, Pute und Faschiertes gemischt) wiesen sowohl Methicillin-resistente Staphylokokken als auch ESBL-bildende Enterobakterien auf.

2 EMPFINDLICHKEITSTESTS

2.1 Methicillin-resistente Staphylokokken

Die Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotika Erythromycin, Azithromycin, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Doxycyclin, Tetracyclin, Teicoplanin, Vancomycin, Clindamycin, Kanamycin, Gentamycin, Ampicillin, Penicillin G, Cefazolin und Cefoxitin wurde bei 9 von 10 Staphylokokken-Isolate bestimmt.

Cefoxitin wird als Marker einer Oxacillin-Resistenz verwendet. Alle 9 getesteten Staphylokokken-Isolate wiesen eine Cefoxitin-Resistenz auf, und sind somit Oxacillin-resistent. Diese Resistenz kann als Bestätigung der chromID MRSA-Agarplatte gedeutet werden. Durch diese Methicillin-Resistenz sind die Isolate auch gegen alle β -Laktamantibiotika (Penicillin, Ampicillin, Cefazolin, Cefoxitin) resistent. 6 Isolate sind resistent gegen Clindamycin, 3 Isolate sind intermediär. 6 Isolate sind resistent gegen Tetrazyklin. Je 3 Isolate sind resistent gegen Erythromycin und Azithromycin. Jeweils ein Stamm ist resistent gegen Ciprofloxacin, Doxycyclin, Norfloxacin. Kein Isolat wies eine Resistenz gegen Teicoplanin, Kanamycin oder Gentamycin auf. Keines der *S. aureus*-Isolate wies eine Vancomycin-Resistenz auf. Eine *vanA*-vermittelte Vancomycin-Resistenz wäre durch einen fehlenden Hemmhof (Zone 6mm) angezeigt. Alle anderen Staphylokokken-Isolate wiesen ebenfalls Hemmhöfe auf.

6 der 9 (66,67%) Isolate wiesen eine Multidrug-Resistenz auf, davon 3 *S. aureus*, 2 *S. xylosus* und 1 *S. sciuri*. Somit sind alle isolierten Methicillin-resistenten *S. aureus* (3 von 3) und *S. xylosus* (2 von 2) sowie 1 von 3 *S. sciuri* gegen drei oder mehr Antibiotikaklassen resistent.

Die Antibiotika Erythromycin und Azithromycin sind Vertreter der Antibiotika-Klasse Makrolide. Ciprofloxacin und Norfloxacin gehören in die Gruppe der Fluorochinolone; Doxycyclin und Tetracyclin zur Gruppe der Tetracycline; Teicoplanin und Vancomycin zu den Glykopeptid-Antibiotika; Clindamycin zu den Lincosamiden; Kanamycin und Gentamycin zu den Aminoglykosiden; Ampicillin, Penicillin G, Cefazolin und Cefoxitin zur Gruppe der β -Laktamantibiotika.

Die Empfindlichkeitsprofile der einzelnen Staphylokokken-Isolate sind in der Tabelle 7 aufgelistet. Eine detaillierte Tabelle mit den Durchmessern der

Hemmhöfe ist im Anhang angeführt (Anhang 1: Antibiogramm der Staphylokokken, Seite 97).

	ERY	AZI	CIP	NO	DO	TE	TEC	VA	DA	K	CN	AM	P	KZ	FOX	MR
<i>S. aureus_P41</i>																
<i>S. aureus_P50</i>																
<i>S. aureus_P57</i>																
<i>S. intermedius_P63</i>																
<i>S. sciuri_P5</i>																
<i>S. sciuri_P6</i>																
<i>S. sciuri_P79</i>																
<i>S. xylosus_P50</i>																
<i>S. xylosus_P57</i>																

Tab. 7: Resistenzprofile von Staphylokokken

Grau, empfindlich; gelb, intermediäre Resistenz; rot, Resistenz; schwarz, Multiresistenz (≥ 3 Antibiotikaklassen). ERY, Erythromycin; AZI, Azithromycin; CIP, Ciprofloxacin; NO, Norfloxacin; DO, Doxycyclin; TE, Tetracyclin; TEC, Teicoplanin; VA, Vancomycin; DA, Clindamycin; K, Kanamycin; CN, Gentamycin; AM, Ampicillin; P, Penicillin G; KZ, Cefazolin; FOX, Cefoxitin; MR, Multidrug-Resistenz (Resistenz gegen 3 oder mehr Antibiotikaklassen).

2.2 ESBL-bildende Enterobakterien

Alle 38 ESBL-bildenden Isolate wurden auf weitere Antibiotikaresistenzen mittels Agardiffusionsmethode nach Kirby-Bauer getestet. Es wurden die Antibiotika Ciprofloxacin, Norfloxacin, Doxycyclin, Tetracyclin, Kanamycin, Gentamycin, Streptomycin, Ampicillin, Cefazolin, und Cefoxitin verwendet.

100% zeigten Resistenz gegenüber den β -Laktamantibiotika Ampicillin und Cefazolin. Das β -Laktamantibiotikum Cefoxitin war bei 97,4 % wirksam. 2,6% (ein *K. pneumoniae*-Isolat) wies eine intermediäre Resistenz gegenüber Cefoxitin auf. Cefoxitin ist ein β -Lactamase stabiles Antibiotikum [WILLE, 2007b] und nicht zwingend unwirksam bei ESBL-Produktion.

Die restlichen Empfindlichkeitsprofile sind: Ciprofloxacin, 10,5% resistent; Norfloxacin, 2,6% resistent und 7,9% intermediär; Doxycyclin, 5,3% resistent und 5,3% intermediär; Tetracyclin, 18,4% resistent; Kanamycin, 2,6% resistent, Gentamycin, 0% resistent; und Streptomycin, 7,9% resistent.

13,2% (5 von 38) der Isolate wiesen eine Multiresistenz auf, davon sind 80% (4 von 5) *Escherichia coli* und 20% (1 von 5) *Escherichia vulneris*.

Die Resistenzprofile der Enterobacteriaceae sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Eine detaillierte Tabelle mit den Durchmessern der Hemmhöfe ist im Anhang angeführt (Anhang 2: Antibiotogramm der Enterobakterien, Seite 99).

	CIP	NO	DO	TE	K	CN	S	AM	KZ	FOX	MR
<i>Enterobacter aerogenes</i> _P21											
<i>Enterobacter aerogenes</i> _P38											
<i>Enterobacter cloacae</i> _P26											
<i>Enterobacter cloacae</i> _P28											
<i>Enterobacter cloacae</i> _P1											
<i>Escherichia coli</i> _P50											
<i>Escherichia coli</i> _P54											
<i>Escherichia coli</i> _P55											
<i>Escherichia coli</i> _P56											
<i>Escherichia coli</i> _P57											
<i>Escherichia coli</i> _P69											
<i>Escherichia coli</i> _P77											
<i>Escherichia vulneris</i> _P47											
<i>Ewingella americana</i> _P58											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>ozeanae</i> _P94											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P27											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P32											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P45											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P55											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P64											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P70											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P71											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P77											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P83											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P84											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P85											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P87											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P89											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P90											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P93											
<i>K. pneumoniae</i> sp. <i>pneumoniae</i> _P95											
<i>Pantoea</i> spp 2_P9											
<i>Pantoea</i> spp 2_P14											
<i>Pantoea</i> spp 2_P61											
<i>Pantoea</i> spp 3_P50											
<i>Serratia plymuthica</i> _P31											
<i>Serratia plymuthica</i> _P62											
<i>Serratia rubidaea</i> _P44											

Tab. 8: Resistenzprofile von Enterobacteriaceae

Grau, empfindlich; gelb, intermediäre Resistenz; rot, Resistenz; schwarz, Multiresistenz (≥ 3 Antibiotikaklassen). CIP, Ciprofloxacin; NO, Norfloxacin; DO, Doxycyclin; TE, Tetracyclin; K, Kanamycin; CN, Gentamycin; S, Streptomycin; AM, Ampicillin; KZ, Cefazolin; FOX, Cefoxitin; MR, Multidrug-Resistenz (Resistenz gegen 3 oder mehr Antibiotikaklassen).

3 DISKUSSION

In dieser Studie konnte in 3% der Proben Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden. In den Niederlanden konnten MRSA aus 11,9% (264 von 2217) der Fleischproben isoliert werden [BOER et al., 2009]. In Iowa, USA, beträgt die MRSA-Prävalenz in Fleischproben im Vergleich nur 1,2% [HANSON et al., 2011]. Hiroi et al. konnten in Japan MRSA in 3% (9 von 300) der Fleischproben nachweisen [HIROI et al., 2012]. Agersø et al. untersuchten dänische Fleischproben, und Fleisch aus europäischen Staaten (hauptsächlich Deutschland und Frankreich) auf das Vorhandensein von MRSA. Die höchste Prävalenz (18%) wies importiertes Hühnerfleisch auf, gefolgt von importiertem Schweinefleisch (7,5%) und Schweinefleisch aus Dänemark (4,6%) [AGERSØ et al., 2012].

Die vorliegende Studie zeigt eine hohe Prävalenz (34%) von ESBL-bildenden Enterobacteriaceae in Frischfleisch, 7% der Proben sind mit ESBL-positiven *E. coli* kontaminiert; ist jedoch geringer als in vergleichbaren Studien. Eine Studie, durchgeführt in Deutschland, konnte in 43,9% der Hühnerfleisch-Proben ESBL-produzierende Enterobacteriaceae nach einer Voranreicherung nachweisen [KOLA et al., 2012]. In den Niederlanden waren 94% der Hühnerfleischproben mit ESBL-positiven *E. coli* kontaminiert, 39% davon waren genetisch ident mit *E. coli*-Isolaten vom Menschen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Übertragung von Bakterien mit ESBL-Produktion von Geflügel auf den Menschen, hauptsächlich über die Lebensmittelkette, hin. In den Niederlanden ist der Antibiotikaeinsatz in der Geflügelindustrie europaweit am höchsten, was der Grund für die hohe Prävalenzrate sein kann [LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2011].

Vancomycin-resistente Enterokokken konnten in dieser Studie in keiner Probe nachgewiesen werden. Bei 16 Proben zeigten sich violette Kolonien mit durchschnittlich 9×10^1 KBE/25g auf chromID VRE. Violette Kolonien deuten auf Vancomycin-resistente *E. faecium* hin. Von diesen 16 Proben konnten nur bei 13 Enterokokken-Wachstum auf KANA nachgewiesen werden. Nach der Gramfärbung der violetten Kolonien von chromID VRE und zusätzlichem Ausstreichen auf KANA zur weiteren Bestätigung konnten jedoch Enterokokken ausge-

schlossen werden. Die Gramfärbung zeigte kokkoide Stäbchen und auf KANA war kein Enterokokken-Wachstum sichtbar. Eine weitere Identifizierung wurde nicht durchgeführt. In dieser Studie konnten somit keine Vancomycin-resistenten Enterokokken nachgewiesen werden.

Nach dem Verbot von Avoparcin als Wachstumsförderer in der Tierzucht ist ein stetiger Rückgang von Vancomycin-resistenten Enterokokken erkennbar. In Deutschland wurde Avoparcin bereits im Jänner 1996 verboten. Dort sank die Prävalenz von VRE in Geflügelproben deutlich 2 Jahre nach dem Verbot. Außerdem war ein Rückgang der Prävalenz in der Darmflora von gesunden Personen (VRE-Carriers) ersichtlich; während sie 1994 12% betrug, sank sie 1997 auf 3% [KLARE et al., 1999]. Mellmann et al. untersuchten Stuhlproben von Menschen und Nutztieren (Milchkühe, Schweine, Hennen) in Österreich. VRE konnten in 5,8% der Proben von Patienten der Intensivstation nachgewiesen werden, jedoch waren die Stuhlproben von gesunden Probanden sowie die der Nutztiere VRE-negativ [MELLMANN et al., 2000]. Messi et al. untersuchten in Italien faschierte Fleischproben (Geflügel, Rind, Schwein, Pferd) und Umweltproben (Oberflächengewässer, Abfälle, Luft, und andere Proben) auf VRE. 35% der Fleischproben und 26,5% der Umweltproben waren VRE-positiv [MESSI et al., 2006]. Eine Studie von Hiroi et al. in Japan konnte keine VRE aus Fleischproben isolieren [HIROI et al., 2012].

Somit dürfte ein regionaler Unterschied in der Prävalenz von VRE bestehen.

Aufgrund der Tatsache, dass neben MRSA auch andere Staphylokokken-Stämme von chromID MRSA durch eine blau/grüne Färbung der Kolonien isoliert wurden, ist dieses Medium nicht selektiv für *S. aureus* und erfordert somit eine weitere Identifizierung. In dieser Studie erfolgte nach der Gramfärbung eine biochemische Identifizierung mittels API Staph (bioMérieux, Frankreich), somit konnten neben Methicillin-resistenten *S. aureus* (n=3) auch Methicillin-resistente *S. sciuri* (n=4), *S. xylosus* (n=2) und *S. intermedius* (n=1) nachgewiesen werden.

Staphylococcus sciuri ist ein Koagulase-negatives, Oxidase-positives Bakterium, dessen klinische Relevanz ansteigt. *S. sciuri* wird mit schweren Infektionen

wie Endokarditis, Peritonitis, septischer Schock sowie Harnwegs- und Wundinfektionen assoziiert. Dakić et al. untersuchten die Prävalenz von *S. sciuri* von Personal, Geräten und Oberflächen in einem Krankenhaus in Belgrad. In 10,5% der Proben konnten *S. sciuri* nachgewiesen werden, davon waren 65,2% resistent gegen Penicillin und 64,3% resistent gegen Oxacillin [DAKIĆ et al., 2005]. *S. sciuri* wurden außerdem von Haustieren (Hunden) [STEPANOVIĆ et al., 2001] und Wildtieren [HAUSCHILD und SCHWARZ, 2003] isoliert. *S. sciuri* und *S. xylosus* konnten auch in Lebensmitteln wie Rohmilch und Käse aus Rohmilch mit einer Prävalenz von 10% und 9% [RUARO et al., 2013] und Nutztieren wie Rind, Schwein, Geflügel, Ziege und Schaf [DEVRIESE et al., 1985] nachgewiesen werden. *S. xylosus* wird auch als Starterkultur für die Fermentation von Fleischprodukten verwendet [ESSID und HASSOUNA, 2013; MAURIELLO et al., 2004].

S. intermedius ist ein koagulase-positives Bakterium und kommt bei gesunden Hunden, aber auch bei Tauben, Füchsen und Pferden vor. Beim Menschen gilt es als zoonotisch pathogenes Bakterium, das aus 18% der durch Hunde verursachten Wunden isoliert wurde [LEE, 1994]. *S. intermedius* konnte neben *S. sciuri* und *S. xylosus* auch in Rindfleisch [SHALE et al., 2005] nachgewiesen werden. *S. intermedius* galt als Auslöser lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüchen in den USA [KHAMBATY et al., 1994].

In dieser Studie wurde eine direkte Kultivierung zum quantitativen Nachweis durchgeführt. Andere Studien reicherten die zu untersuchenden Bakterien vor dem eigentlichen Nachweis an. Hanson et al. untersuchten die Prävalenz von *S. aureus* und MRSA in Fleisch und führten eine 24-stündige Voranreicherung durch. Die *S. aureus*-Prävalenz betrug 16,4% (27 von 165), von diesen 27 *S. aureus*-Isolaten waren zwei Methicillin-resistent [HANSON et al., 2011]. Eine Voranreicherung wird in einigen Studien auch bei dem Nachweis von ESBL-bildenden Enterobakterien durchgeführt. Kola et al. bestimmten das Vorhandensein von ESBL-bildenden Enterobacteriaceae in Hühnerfleisch in Deutschland nach einer Anreicherung in einer tryptischen Sojälösung. 43,9% der getesteten Proben waren ESBL-positiv [KOLA et al., 2012]. Kuch et al. testeten Se-

lektivmedien für den Nachweis von VRE aus Stuhlproben. Die Sensitivität war nach einer 18-24-stündigen Anreicherung signifikant höher [KUCH et al., 2009]. Klein et al. untersuchten faschiertes Rind- und Schweinefleisch auf das Vorhandensein von VRE. Zum quantitativen Nachweis wurde eine direkte Kultivierung durchgeführt, zum qualitativen Nachweis eine vorhergehende Anreicherung. Ohne Voranreicherung betrug die Prävalenz von VRE 0,5%, mit Anreicherung hingegen 8% [KLEIN et al., 1998]. Demnach wäre es möglich, dass in dieser Studie VRE nach einer Anreicherung nachgewiesen hätten werden können.

Es ist noch zu erwähnen, dass in dieser Studie rohes Fleisch analysiert wurde. Durch entsprechende Erhitzung wird die Anzahl an Mikroorganismen reduziert. Depoorter et al. führten 2012 eine Modellstudie zur Erfassung der menschlichen Exposition mit *E. coli*, die resistent gegen Cephalosporine der 3. Generation (CREC) sind, durch den Konsum von Masthähnchen durch. Die Konzentration von CREC ist nach der Schlachtung und im Einzelhandel relativ hoch, $2,6 \cdot 10^2$ KBE CREC /g auf der vollständigen Karkasse, $1,2 \cdot 10^2$ KBE/g auf Hühnerfleischstücke und Hühnerfleischzubereitungen (faschiert). Wenn die Kühlkette nicht eingehalten wird, steigt die durchschnittliche Konzentration an. Eine Tiefkühlagerung führt zu einer Reduktion von CREC. Das Kochen inaktiviert alle CREC in der ganzen Karkasse und in Hühnerfleischstücke; während in den Fleischzubereitungen nicht alle CREC inaktiviert werden konnten ($0,7$ KBE/g nach dem Kochen). Die Wahrscheinlichkeit einer CREC-Aufnahme von 10^3 KBE/g mit einer Mahlzeit die Hühnerfleisch enthält, liegt bei 1,5%. Dabei dürfte eine Kreuz-Kontamination in der Küche den größeren Teil beitragen als eine ungenügende Erhitzung. Bakterien können von Fleisch auf rohes Gemüse übertragen werden indem die Hände durch das Fleisch kontaminiert wurden und/oder durch die Verwendung des gleichen Schneidbrettes und Messers zum Zerkleinern des Gemüses [DEPOORTER et al., 2012].

Das Risiko für den Menschen durch mit antibiotikaresistenten Bakterien kontaminierte Lebensmittel lässt sich nicht einzig auf deren Vorhandensein in den Lebensmitteln abschätzen. Weitere Faktoren wie das Erhitzen oder Küchenhygiene spielen eine wesentliche Rolle.

Der Nachweis von Resistenzgenen erfolgte in dieser Studie nicht, da das mögliche Vorhandensein von antibiotikaresistenten Bakterien im Vordergrund stand. Die detaillierte Untersuchung von mobilen Gen-Abschnitten von Isolaten menschlichen und tierischen Ursprungs kann jedoch einen Beitrag zum besseren Verständnis der Epidemiologie leisten. Ebenso sollte die Transmission von Resistenzgenen durch die Mechanismen des horizontalen Gentransfers und die Bedeutung von Lebensmitteln weiter erforscht werden, um die Wirksamkeit von Antibiotika auf Dauer gewährleisten zu können und einer weiteren Verbreitung von Resistenzen entgegenzuwirken.

V. SCHLUSSBETRACHTUNG

Die Auswirkungen von antibiotikaresistenten Bakterien auf die Gesundheit des Menschen sind oft schwerwiegend. Infektionen mit resistenten Erregern sind im Vergleich zu Infektionen mit empfindlichen Erregern schwerer zu behandeln. Eine angemessene Therapie mit Antibiotika, gegen die die Bakterien empfindlich sind, setzt oft verzögert ein. Die Folgen sind Verlängerung der Krankheitsdauer und des Krankenhausaufenthalts, sowie steigende Kosten, einerseits durch den längeren Aufenthalt im Krankenhaus und andererseits durch die Verwendung von Reserve-Antibiotika, die meist teurer und toxischer für den menschlichen Körper sind.

Doch welche Rolle spielen Lebensmittel bei der Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien?

- Antibiotikaresistente Bakterien sind Bakterien, die gegenüber bestimmten Antibiotika unempfindlich und somit weiterhin vermehrungsfähig sind. Die intrinsische Resistenz ist ein natürliches Phänomen und kommt bei allen Mitgliedern einer Spezies vor. Der Mechanismus dieser Resistenz beruht auf dem physiologischen Aufbau bzw. auf der biochemischen Ausstattung der Spezies. Bakterien können auch eine Antibiotikaresistenz durch Mutation von Struktur- oder Regulatorgenen oder durch Aufnahme von chromosomaler oder extrachromosomaler DNA-Abschnitte (Plasmide) erwerben. Diese erworbene Resistenz kommt in gewissen Abstammungslinien vor und nicht in der gesamten Bakterienspezies.
- Der Einsatz von Antibiotika resultiert in der Selektion resistenter Mikroorganismen. So entstehen sowohl in der Humanmedizin, Veterinärmedizin als auch im Pflanzenbau resistente Bakterien. Wenn sich Resistenzen erst einmal entwickelt haben, können die dafür verantwortlichen Gene über verschiedene Transfermechanismen auf andere Bakterien übertragen werden. Zu diesen Mechanismen zählen Konjugation, Transformation und Trans-

duktion. Durch die Aufnahme und Expression mehrerer Resistenzgene entstehen multiresistente Bakterien, die nicht nur gegen ein Antibiotikum unempfindlich sind sondern gegen mehrere.

- Weltweit können antibiotikaresistente Bakterien in Lebensmitteln nachgewiesen werden. Hauptsächlich werden tierische Lebensmitteln analysiert, vor allem Fleisch. Wenn Nutztiere mit Antibiotika behandelt werden, dann kommt es im Darm der Tiere zur Selektion resistenter Bakterien. Während der Schlachtung und durch äußere Einflüsse können diese Bakterien auf das Fleisch und somit in die Lebensmittelkette des Menschen gelangen. Fleisch und Fleischprodukte stellen eine wesentliche Route bei dem Transfer von antibiotikaresistenten Bakterien von Tier auf den Menschen dar.
- In Aquakulturen finden Antibiotika ebenfalls Verwendung. Sie werden in das Futter gemischt, jedoch können Fische Antibiotika nicht effektiv metabolisieren und scheiden den Großteil aus. Die Mengen an Antibiotika im nicht konsumierten Futter und Fischfäzes reichern sich im Sediment an und können durch die Strömung auch in andere Gebiete verbreitet werden. Diese Rückstände üben Selektionsdruck auf die natürliche Mikroflora im Sediment aus.
- Einige Antibiotika, die in der Veterinärmedizin eingesetzt werden, besitzen ähnliche Wirkkomponenten wie jene in der Humanmedizin. Da die Lebensräume von Menschen und Tieren miteinander verbunden sind, besteht ein gemeinsamer Selektionsdruck auf Bakterien wodurch Kreuzresistenzen entstehen können. Als Beispiel ist hier Avoparcin und Vancomycin zu erwähnen. Beides sind Antibiotika der Glykopeptid-Klasse. Avoparcin wurde in der Tierzucht als Leistungsförderer eingesetzt. Vancomycin ist ein Antibiotikum in der Humanmedizin. Da beide Antibiotika dieselbe Wirkkomponente haben, führt die Resistenz gegen ein Antibiotikum auch zur Resistenz gegen das andere. Es entsteht die sogenannte Kreuzresistenz. Da immer mehr Vancomycin-resistente Enterokokken auftraten, hat die EU das Verbot

für die Verwendung von Avoparcin erlassen. Der Einsatz von Antibiotika in der Tierzucht als Leistungsförderer wurde von der EU generell verboten um der weiteren Entstehung und Verbreitung von Resistenzen entgegen zu wirken.

- Die Verwendung von Antibiotika im Pflanzenbau ist im Vergleich zu jenen in der Human- und Veterinärmedizin gering. Pflanzen erkranken hauptsächlich durch Viren oder Pilze, Bakterien spielen eine eher untergeordnete Rolle. Feuerbrand ist ein Beispiel für eine bakterielle Erkrankung von Obstbäumen (Äpfel-, Birnenbäume). Der Einsatz des Antibiotikums Streptomycin muss prophylaktisch erfolgen und erfolgt ausschließlich durch die „Gefahr im Verzug“-Regelung. Streptomycin-resistente Stämme von *Erwinia amylovora* sind bereits bekannt. Pflanzen werden allerdings auch durch Abwasser oder Gülle mit resistenten Bakterien kontaminiert. Wenn Tiere mit Antibiotika behandelt werden, entstehen resistente Bakterien, die ausgeschieden werden. Durch das Aufbringen von Gülle auf die Felder als Dünger, können somit resistente Bakterien auf Pflanzen und auch in die aquatische Umwelt gelangen. Antibiotikaresistente Erreger können durch den Konsum von rohem Obst und Gemüse in den menschlichen Körper gelangen.
- Mikroorganismen können durch Kontamination während der Schlachtung, durch Umwelteinflüsse, sogenannte Postkontamination, oder durch bewusstes Hinzufügen aus technologischen Gründen in Lebensmittel gelangen. Wenn diese Mikroorganismen Antibiotikaresistenzgene tragen, können diese während der Lebensmittelherstellung und –verarbeitung sowie nach Nahrungsaufnahme im menschlichen Verdauungstrakt auf andere Erreger beziehungsweise auf die menschliche Darmflora übertragen werden.
- Eine indirekte Gefahr geht durch die Möglichkeit des horizontalen Gentransfers aus, wodurch Resistenzgene auf für den Menschen pathogene Bakterien übertragen werden können. Pathogene Bakterien können für alle Menschen gefährlich werden. Eine Resistenz dieser Bakterien erschwert die

Behandlung und den Krankheitsverlauf. Resistente opportunistische Bakterien stellen ein Risiko für Menschen mit schlechtem Gesundheitszustand dar, wie zum Beispiel alte Menschen, Kinder und Personen mit Krankheiten wie AIDS oder Krebs. Kommensale Bakterien, die Resistenzgene tragen, sind problematisch in Bezug auf die Verbreitung der Resistenzgene.

- Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* MRSA konnten in rohen Fleischproben in Asien, Kanada, Europa und USA nachgewiesen werden, mit einer Prävalenz von 1% in Asien bis zu 12% in den Niederlanden. Das Vorkommen von MRSA ist nicht auf eine Tierart beschränkt, sondern in Schweine-, Hühner- und Rindfleisch nachweisbar. Die Methicillinresistenz wird durch die Aufnahme einer mobilen Genkassette (*Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, SCC*mec*) und die Expression des *mecA*-Gens verursacht. MRSA sind resistent gegen alle β -Laktamantibiotika. Ca. 20-25% aller *S. aureus* Stämme sind Methicillin-resistent.
- Extended-spectrum- β -Laktamase (ESBL-) bildende Bakterien sind Bakterien mit der Fähigkeit β -Laktamasen mit erweitertem Wirkungsbereich zu produzieren. Somit sind diese Bakterien gegen β -Laktam-Antibiotika resistent. Die Bildung von ESBL wird hauptsächlich bei *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *K. oxytoca*, sowie bei *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella enterica*, *Enterobacter* spp. und *Morganella morganii* beobachtet. Diese Bakterien konnten bei Legehennen und Mastkälbern und bei Puten- und Schweinefleisch nachgewiesen werden.
- Vancomycin-resistente Enterokokken VRE konnten in europäischen Staaten bei nicht-hospitalisierten Menschen, Bauern, Nutztieren, Fleischprodukten und Abwasserkläranlagen nachgewiesen werden. Es gibt verschiedene Resistenzmechanismen, wobei den Genen *vanA* und *vanB* die größte klinische Bedeutung zukommen. Enterokokken besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber semisynthetischen Penicillinen, Monobactame und allen Cephalosporinen und sind die zweit- bis dritthäufigsten Erreger von noso-

komialen Infektionen. Durch die natürliche Resistenz gegenüber vielen Antibiotika hat eine zusätzliche Vancomycin-Resistenz dramatische Auswirkungen auf die therapeutischen Möglichkeiten.

- Für die Gewährleistung der Effektivität einer Behandlung ist eine Gegensteuerung weiterer Resistenzentwicklungen und Verbreitung, die durch den Antibiotikagebrauch in allen Sektoren angetrieben wird, entscheidend. Das Vorkommen von Resistenzen in einem Sektor oder Land beeinflusst auch das Vorkommen in anderen Sektoren oder Ländern, somit bestehen keine ökologischen, sektorenspezifischen oder geographischen Grenzen. Regierungen, Humanmediziner und Veterinärmediziner, Patienten und Landwirte haben eine Schlüsselrolle in der Verhinderung weiterer Entwicklungen und Verbreitungen von Resistenzen. Daher wäre es sinnvoll, ein Bewusstsein in der Bevölkerung für dieses Gesundheitsproblem zu schaffen und somit einen vernünftigeren und vor allem nachhaltigeren Umgang mit Antibiotika zu erreichen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befasst sich mit der Kontamination von Lebensmitteln mit antibiotikaresistenten Bakterien und die davon ausgehenden Risiken für die menschliche Gesundheit.

In den verschiedenen Bereichen Human-, Veterinär- und Phytomedizin, in denen Antibiotika zur Therapie, Prophylaxe oder als Masthilfsmittel eingesetzt werden, entstehen resistente Mikroorganismen. Die genetischen Informationen, die für die Resistenzen verantwortlich sind, können über verschiedene Mechanismen vertikal oder horizontal verbreitet werden. Bei der Aufnahme und Expression mehrerer Resistenzgene entstehen Multiresistenzen. Rund 70% der Bakterien nosokomialer Infektionen sind unempfindlich gegen mindestens ein antibakterielles Medikament. Infektionen mit resistenten Erregern resultieren in schwereren und länger anhaltenden Erkrankungen, in steigenden Hospitalisierungsraten, höherer Mortalitätsrate und steigenden Kosten. Besonders in den letzten 20-30 Jahren stiegen die Resistenzraten verschiedener Bakterienspezies deutlich an. Mehr als 25000 Menschen sterben jährlich in der Europäischen Union an Infektionen verursacht von antibiotikaresistenten Bakterien.

Ein Risiko für die menschliche Gesundheit könnte auch von antibiotikaresistenten Bakterien ausgehen, die durch den Konsum von Lebensmitteln aufgenommen werden. Durch den Einsatz von Antibiotika in der Tierzucht entstehen resistente Mikroorganismen im Darm der Tiere. Während der Schlachtung besteht die Möglichkeit der Kontamination des Fleisches mit diesen Bakterien. Weltweit konnten resistente Bakterien in Fleischprodukten nachgewiesen werden. Wenn die Ausscheidung der Nutztiere als Gülle auf die Felder zur Düngung aufgetragen wird, können resistente Bakterien auch pflanzliche Lebensmittel und die aquatische Umwelt kontaminieren. Durch den Verzehr von Lebensmitteln besteht die Möglichkeit des Gentransfers von resistenten Bakterien auf Bakterien der natürlichen Darmflora. Der Resistenzgentransfer findet auch zwischen Bakterien der Darmflora und auf pathogene Bakterien statt.

Besonderes Augenmerk wurde auf Methicillin-resistente Staphylokokken, Extended-spectrum- β -Laktamase (ESBL-) bildende Enterobakterien und Vancomycin-resistente Enterokokken gelegt. In dieser Arbeit wurde rohes Fleisch von Rind, Kalb, Schwein, Huhn und Pute auf das Vorkommen dieser resistenten Bakterien untersucht. Die Ergebnisse sind wie folgt:

- 10 Methicillin-resistente Staphylokokken-Stämme konnten in 8% (8 von 100) der Proben nachgewiesen werden, davon sind
 - 40% (4 von 10) *Staphylococcus sciuri*,
 - 30% (3 von 10) *Staphylococcus aureus*,
 - 20% (2 von 10) *Staphylococcus xylosus*,
 - 10% (1 von 10) *Staphylococcus intermedius*.

Die Keimzahl lag zwischen 1×10^1 und $1,3 \times 10^2$ KBE/25g. MRSA kam im Ausmaß von 1×10^1 bis $1,1 \times 10^2$ KBE/25g vor.

66,67% (6 von 9) der Isolate sind resistent gegen Clindamycin, 33,33% (3 von 9) der Isolate sind intermediär. 66,67% der Isolate sind resistent gegen Tetrazyklin. Je 33,33% der Isolate sind resistent gegen Erythromycin und Azithromycin. Jeweils 11,11% (1 von 9) ist resistent gegen Ciprofloxacin, Doxycyclin und Norfloxacin. Kein Isolat wies eine Resistenz gegen Teicoplanin, Kanamycin oder Gentamycin auf. 6 der 9 (66,67%) Isolate wiesen eine Multidrug-Resistenz auf, davon 3 *S. aureus*, 2 *S. xylosus* und 1 *S. sciuri*.

- Aus 34% (34 von 100) der Proben konnten 38 ESBL-bildende Stämme isoliert werden:
 - 42,1% (16 von 38) *Klebsiella pneumoniae sp pneumoniae*,
 - 18,4% (7 von 38) *Escherichia coli*,
 - 7,9% (3 von 38) *Enterobacter cloacae*,
 - 7,9% (3 von 38) *Pantoea spp 2*,
 - 5,3% (2 von 38) *Enterobacter aerogenes*,
 - 5,3% (2 von 38) *Serratia plymuthica*,

je 2,6% (1 von 38) von *Escherichia vulneris*, *Klebsiella pneumoniae* sp. *ozeanae*, *Serratia rubidaea*, *Ewingella americana*, *Pantoea* spp. 3.

Die Keimzahl lag zwischen 1×10^1 und 7×10^4 KBE/25g, wobei bei 25 von 38 Isolaten eine Keimzahl unter 8×10^1 KBE/25g vorlag. 5 Isolaten kamen im Ausmaß von über $1,3 \times 10^3$ KBE/25g vor, darunter drei *K. pneumoniae*-Isolate und je ein *E. cloacae*- und *Pantoea* spp. 3 –Isolat. Die Anzahl an ESBL-bildenden *E. coli* lag zwischen 1×10^1 und $2,9 \times 10^2$ KBE/25g.

100% zeigten Resistenz gegenüber den β -Laktamantibiotika Ampicillin und Cefazolin. Das β -Laktamantibiotikum Cefoxitin war bei 97,4 % wirksam. Ein Isolat (2,6%) wies eine intermediäre Resistenz gegenüber Cefoxitin auf. Die restlichen Empfindlichkeitsprofile sind: Ciprofloxacin, 10,5% resistent; Norfloxacin, 2,6% resistent und 7,9% intermediär; Doxycyclin, 5,3% resistent und 5,3% intermediär; Tetracyclin, 18,4% resistent; Kanamycin, 2,6% resistent, Streptomycin, 7,9% resistent und Gentamycin, 0% resistent;. 13,2% (5 von 38) der Isolate wiesen eine Multiresistenz auf, davon sind 80% (4 von 5) *Escherichia coli* und 20% (1 von 5) *Escherichia vulneris*.

- Vancomycin-resistente Enterokokken konnten in keiner Probe nachgewiesen werden.
- 3% aller Proben (je 1% Kalb, Pute, Faschiertes gemischt) wiesen sowohl Methicillin-resistente Staphylokokken als auch ESBL-bildende Enterobakterien auf.
- Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Rolle von tierischen Lebensmitteln als Reservoir von multiresistenten Bakterien. Sie unterstreichen die Notwendigkeit der Überwachung von übertragbaren Zoonoseerregern entlang der Lebensmittelkette.

VII. SUMMARY

This paper focuses on the contamination of food with antibiotic resistant bacteria and the associated risks for the human health.

Resistant microorganisms are developing in various parts like human medicine, veterinary medicine and phyto medicine, where antibiotics are used for therapy, prophylaxis or as growth promoter. The genetic information responsible for the resistance can be transmitted vertical and horizontal via different mechanisms. The creation of multidrug resistances arises when more than one resistance gene is taken up and expressed. Infections caused by resistant bacteria result in severe and longer-lasting diseases and increased hospitalization rates, and therefore the costs also increase. Mortality increases because of treatment failures. The number of multi-resistant bacteria is raising, especially in the last 20-30 years the resistance rates of various bacteria have increased. About 70% of bacteria which cause nosocomial infections are resistant to at least one antibacterial drug. In the European Union more than 25000 people die each year from the consequences of infections with resistant bacteria.

Food can be contaminated with resistant bacteria and can also constitute a risk for human health. There are several ways how resistant bacteria or resistance genes can be present in food. Antibiotics are used in animal breeding, so resistant bacteria can occur in the gut of animals. During slaughter these bacteria can contaminate meat. Resistant microorganisms can be found in meat products worldwide. Vegetables and aquatic environment can also be contaminated if manure is applied as fertilizer on the fields. So by eating such food it is possible that there occurs gene transfer from resistant bacteria to bacteria of the natural intestinal microflora. Gene transfer also takes place between bacteria of the intestinal flora but also to pathogenic bacteria.

Special attention is to put on methicillin-resistant staphylococci, extended-spectrum- β -lactamase producing bacteria and vancomycin-resistant enterococ-

ci. In the present study raw meat samples of beef, veal, pork, chicken and turkey were analysed to evaluate the presence of these resistant bacteria.

- 10 methicillin-resistant staphylococci were found in 8% (8/100) of meat samples:

40% (4/10) *Staphylococcus sciuri*,
30% (3/10) *Staphylococcus aureus*,
20% (2/10) *Staphylococcus xylosus*,
10% (1/10) *Staphylococcus intermedius*

The bacterial count was between 1×10^1 and $1,3 \times 10^2$ CFU/25g. Resistant *S. aureus* was found in the range 1×10^1 - $1,1 \times 10^2$ CFU/25g.

66,67% were resistant to clindamycin and to tetracycline. 33,33% were resistant to erythromycin, to azithromycin and were intermediate to clindamycin. 11,11% were resistant to ciprofloxacin, doxycycline and norfloxacin, but no isolate were resistant to teicoplanin, kanamycin or gentamicin. 6 out of 9 isolates (*S. aureus* n=3, *S. xylosus* n=2, *S. sciuri* n=1) showed multidrug-resistance.

- 38 ESBL-producing bacteria were present in 34% (34/100) of meat samples:

42,1% (16/38) *Klebsiella pneumoniae* sp *pneumoniae*,
18,4% (7/38) *Escherichia coli*,
7,9% (3/38) *Enterobacter cloacae*,
7,9% (3/38) *Pantoea* spp 2,
5,3% (2/38) *Enterobacter aerogenes*,
5,3% (2/38) *Serratia plymuthica*,
each 2,6% (1/38) of *Escherichia vulneris*, *Klebsiella pneumoniae* sp *ozeanae*, *Serratia rubidaea*, *Ewingella americana*, *Pantoea* spp 3.

The bacterial count was ranging from 1×10^1 to 7×10^4 CFU/25g, but 25 of 38 isolates were detected less than 8×10^1 CFU/25g. 5 isolates were detected more than $1,3 \times 10^3$ CFU/25g, thereof were 3 *K. pneumoniae*-

isolates, 1 *E. cloacae* and 1 *Pantoea spp.* 3 isolate. ESBL-producing *E. coli* was found in the range of 1×10^1 – $2,9 \times 10^2$ CFU/25g.

All isolates were resistant to the β -lactam-antibiotics ampicillin and cefazolin, but ceftiofur was powerful to 97,4%. One isolate (2,6%) was intermediate resistant to ceftiofur. The remaining results of the antibiotic susceptibility test were: ciprofloxacin 10,5% resistant, norfloxacin 2,6% resistant and 7,9% intermediate, doxycycline 5,3% resistant and 5,3% intermediate, tetracycline 18,4% resistant, kanamycin 2,6% resistant, streptomycin 7,9% resistant, gentamycin 0% resistant. 13,2% (5/38) of the isolates showed multidrug-resistance, thereof are 80% (4/5) *Escherichia coli* and 20% (1/5) *Escherichia vulneris*.

- Vancomycin-resistant enterococci were not present in any meat sample.
- 3% of all meat samples (each one of veal, turkey, minced meat of beef and pork mixed) showed both methicillin-resistant staphylococci and ESBL-producing Enterobacteriaceae.
- In conclusion, this study confirms the role of animal-based foods as a reservoir of multidrug-resistant bacteria and underscores the need for continuing surveillance of food-borne zoonotic pathogens along the food chain.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

AGERSØ Y, HASMAN H, CAVACO LM, PEDERSEN K, AARESTRUP FM.

Study of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Danish pigs at slaughter and in imported retail meat reveals a novel MRSA type in slaughter pigs. *Veterinary Microbiology*, 2012; 157(1-2): 246-250.

AGES: „Wo stehen wir heute? – Antibiotika in der Nutztierhaltung und mögliche Konsequenzen“. Internet:

<http://www.ages.at/ages/gesundheit/mensch/antibiotikaresistenzen/antibiotika-in-der-nutztierhaltung-und-moegliche-konsequenzen/> (Stand: 18.01.2013)

AGES: „Zum Einsatz von Streptomycin als Pflanzenschutzmittel - Bewertung aus Sicht der Humanmedizin mit Stand 29.11.2008“. 2008.

ALANIS A J. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research*, 2005; 36: 697-705.

AUTENRIETH IB. Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathologische Aspekte. *Journal für Ernährungsmedizin* 2000; 4: 6-9.

BIDET P, BURGHOFFER B, GAUTIER V, BRAHIMI N, MARIANI-KURKDJIAN P, EL-GHONEIMI A, BINGEN E, ARLET G. In Vivo Transfer of Plasmid-Encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an Infant and Selection of Impermeability to Imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005; 3562-3565.

BOER E, ZWARTKRUIS-NAHUIS JTM, WIT B, HUIJSDENS XW, NEELING AJ, BOSCH T, OOSTEROM RAA, VILA A, HEUVELINK AE. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 2009; 134: 52-56.

BONOMO J, GILL RT. Antibiotic resistance as a model for strain engineering. Computers and Chemical Engineering 2005; 29: 509-517.

BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung: ESBL-bildende Bakterien in Lebensmitteln und deren Übertragbarkeit auf den Menschen. Stellungnahme Nr. 002/2012. Internet: www.bfr.bund.de (Stand: 12.10.2012)

BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung: MRSA in Lebensmittel? Stellungnahme Nr. 015/2009 vom 26. März 2008.

BMG, Bundesministerium für Gesundheit: Resistenzbericht Österreich AURES 2010. Wien, 2011. Internet: <http://www.bmg.gv.at/home/Schwerpunkte/Krankheiten/Antibiotikaresistenz/> (Stand: 2.10.2012)

BMG, Bundesministerium für Gesundheit: Resistenzbericht Österreich AURES 2011. Wien, 2012. Internet: <http://www.bmg.gv.at/home/Schwerpunkte/Krankheiten/Antibiotikaresistenz/> (Stand: 18.01.2013)

CABELLO FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology, 2006; 8: 1137-1144.

CARLTON RM, NOORDMAN WH, BISWAS B, DE MEESTER ED, LOESSNER MJ. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformation analyses, oral toxicity study, and application. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2005; 43: 301-312.

CARMELI Y, MOZAFFARI E. Health and Economic Outcomes of Vancomycin-Resistant Enterococci. Arch Intern Med. 2002; 19: 2223-2228.

CETINKAYA Y, FALK P, MAYHALL CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clinical Microbiology Reviews. 2000; 686-707.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

COLEMAN BL, LOUIE M, SALVADORI MI, McEWEN SA, NEUMANN N, SIBLEY K, IRWIN RJ, JAMIESON FB, DAIGNAULT D, MAJURY A, BRAITHWAITE S, CRAGO B, McGEER AJ. Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*. Water Research, 2013; 9:3026-3036.

COLOMER-LLUCH M, JOFRE J, MUNIESA M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. PLoS ONE, 2011; 6: e17549:1-e17549:11.

CRAGO B, FERRATO C, DREWS S J, SVENSON L W, TYRRELL G, LOUIE M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. Food Microbiology, 2012; 32: 202-205.

DAKIĆ I, MORRISON D, VUKOVIĆ D, SAVIĆ B, SHITTU A, JEŽEK P, HAUSCHILD T, STEPANOVIĆ S. Isolation and Molecular Characterization of *Staphylococcus sciuri* in the Hospital Environment. Journal of Clinical Microbiology, 2005; 43(6): 2782-2785.

DAVID MZ, DAUM RS. Community-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. Clinical Microbiology Reviews, 2010; 23(3): 616-687.

DEPOORTER P, PERSONS D, UYTENDAELE M, BUTAYE P, De ZUTTER L, DIERICK K, HERMAN L, IMBERECHTS H, Van HUFFEL X, DEWULF J. Assessment of human exposure to 3rd generation cephalosporin resistant *E. coli* (CREC) through consumption of broiler meat in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 2012; 159(1): 30-38.

DEVRIESE LA, SCHLEIFER KH, ADEGOKE GO. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. *Journal of Applied Microbiology*, 1985; 58(1):45-55.

DOMIG KJ. Antibiotikaresistenz und der Einsatz von Antibiotika in der Tierernährung. 4. BOKU-Symposium Tierernährung, 2005; 1-9.

ECDC European Centre of Disease Prevention and Control. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). 2005-2013.
Internet: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/database.aspx> (Stand: 29.06.2013)

EFSA. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal*, 2007; 587: 1-16.

ESSID I, HASSOUNA M. Effect of inoculation of selected *Staphylococcus xylosus* and *Lactobacillus plantarum* strains on biochemical, microbiological and textural characteristics of a Tunisian dry fermented sausage. *Food Control*, 2013; 32(2): 707-714.

FARIA C, VAZ-MOREIRA I, SERAPICOS E, NUNES OC, MANAIA CM. Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Science of The Total Environment*, 2009; 12: 3876-3882.

FETSCH A. MRSA in der Lebensmittelkette: Status quo. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin 2012.

GAY PB, GILLESPIE SH. Antibiotic resistance markers in genetically modified plants: a risk to human health? *The Lancet Infectious Diseases*, 2005; 5: 637-646.

GOODE D, ALLEN VM, BARROW PA. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003; 69:5032-5036.

GROSS U. Allgemeine Bakteriologie. In: Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2009; 25-114.

GROTE M, SCHWAKE-ANDUSCHUS C, STEVENS H, MICHEL R, BETSCHE T, FREITAG M. Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden – Ergebnisse eines Modellversuchs. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2006; 1(1): 38-50.

HANSON BM, DRESSLER AE, HARPER AL, SCHEIBEL RP, WARDYN SE, ROBERTS LK, KROEGER JS, SMITH TC. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health*, 2011; 4: 169-174.

HARBOTTLE H, THAKUR S, ZHAO S, WHITE D G. Genetics of Antimicrobial Resistance. *Animal Biotechnology*, 2006; 17: 111-124.

HAUSCHILD T, SCHWARZ S. Differentiation of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from free-living rodents and insectivores. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 2003; 50(5): 241-246.

HIROI M, KAWAMORI F, HARADA T, SANO Y, MIWA N, SUGIYAMA K, HARA-KUDO Y, MASUDA T. Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens from Retail Raw Meats and Food-Producing Animals in Japan. *Journal of Food Protection*, 2012; 75(10): 1774-1782.

HIRSH DC, BURTON GC, BLENDEN DC, TSUTAKAWA R. The Effect of Tetracycline upon Establishment of *Escherichia coli* of Bovine Origin in the Enteric Tract of Man. *Journal of Applied Microbiology*, 1974; 37(3): 327-333.

KHAMBATY FM, BENNETT RW; SHAH DB. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiology and Infection*, 1994; 75-81.

KHARAZMI M, HAMMES WP, HERTEL C. Construction of a marker rescue system in *Bacillus subtilis* for detection of horizontal gene transfer in food. *Systematic and applied Microbiology*, 2002; 25(4): 471-477.

KLARE L, BADSTÜBNER D, KONSTABEL C, BÖHME G, CLAUS H, WITTE W. Decreased Incidence of VanA-type Vancomycin-Resistant Enterococci isolated from Poultry Meat and from Fecal Samples of Humans in the Community after Discontinuation of Avoparcin Usage in Animal Husbandry. *Microbial Drug Resistance*, 1999; 5(1): 45-52.

KLARE L, WITTE W, WENDT C, WERNER W. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE): Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung. *Bundesgesundheitsblatt*, 2012; 55: 1387-1400.

KLEES S. Antibiotikaresistenzen: MRSA und ESBL. *Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Ostwestfalen-Lippe, Postille Nr. 174*, 2012.

KLEIN G, PACK A, REUTER G. Antibiotic Resistance Patterns of Enterococci and Occurrence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Raw Minced Beef and Pork in Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998; 1825-1830.

KOLA A, KOHLER C, PFEIFER Y, SCHWAB F, KÜHN F, SCHULZ K, BALAU V, BREITBACH K, BAST A, WITTE W, GASTMEIER P, STEINMETZ I. High prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012; 67: 2631-2634.

KUCH A, STEFANIUK E, OZOROWSKI T, HRYNIEWICZ W. New selective and differential chromogenic agar medium, chromID VRE, for screening vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *Journal of Microbiological Methods*, 2009; 77: 124-126.

LAVILLA S, GONZÁLEZ-LÓPEZ JJ, MIRÓ E, DOMÍNGUEZ A, LLAGOSTERA M, BARTOLOMÉ RM, MIRELIS B, NAVARRO F, PRATS G. Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *Journal of Antimicrobials Chemotherapy*, 2008; 61: 1244-1251.

LEDEBOER N, HODINKA R L. Molecular Detection of Resistance Determinants. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011; 49: S20-S24.

LEE J. *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds. *Journal of Infection*, 1994; 29(1):105.

LEVERSTEIN-VAN HALL MA, DIERIKX CM, COHEN STUART J, VOETS GM, van den MUNCKHOF MP, van ESSEN-ZANDBERGEN A, PLATTEEL T, FLUIT AC, van de SANDE-BRUINSMA N, SCHARINGA J, BONTEN MJM, MEVIUS DJ. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011; 17:873-880.

LODISE TP, McKINNON PS. Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2005; 52: 113-122.

MAURIELLO G, CASABURI A, BLAIOTTA G, VILLANI F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science*, 2004; 67(1): 149-158.

McMANUS P, STOCKWELL VO, SUNDIN GW, JONES AL. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*. 2002; 40: 443-465.

MELLMANN A, ORTH D, DIERICH MP, ALLERBERGER F, KLARE I, WITTE W. Nosocomial cross transmission as a primary cause of vancomycin-resistant enterococci in Austria. *Journal of Hospital Infection*, 2000; 44(4): 281-287.

MESSI P, GUERRIERI E, DE NIEDERHÄUSERN S, SABIA C, BONDI M. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *International Journal of Food Microbiology*, 2006; 107: 218-222.

MELZER M, PETERSEN I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *Journal of Infection*, 2007; 55: 254-259.

MULVEY MR, SIMOR AE. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? Canadian Medical Association Journal, 2009; 180(4): 408-415.

NAKAMINAMI H, NOGUCHI N, NISHIJMA S, KUROKAWA S, SO H, SASATSU M. Transduction of the plasmid encoding antiseptic resistance gene *qacB* in *Staphylococcus aureus*. Biological and pharmaceutical Bulletin, 2007; 30: 1412-1415.

OLIVEIRA PH, MAIRHOFER J. Marker-free plasmids for biotechnological applications – implications and perspectives. Trends of Biotechnology, 2013; 1-9.

PESAVENTO G, DUCCI B, COMODO N, LO NOSTRO A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Food Control, 2007; 18: 196-200.

ROCA M, CASTILLO M, MARTI P, ALTHAUS RL, MOLINA MP. Effect of Heating on the Stability of Quinolones in Milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010; 58: 5427-5431.

ROMERO J, FEIJOO CG, NAVARRETE P. Antibiotics in Aquaculture- Use, Abuse and Alternatives. Health and Environment in Aquaculture, 2012. Internet: <http://www.intechopen.com/books/health-and-environment-in-aquaculture/antibioticsin-aquaculture-use-abuse-and-alternatives> (Stand: 15.5.2013)

RUARO A, ANDRIGHETTO C, TORRIANI S, LOMBARDI A. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. Food Microbiology, 2013; 34: 106-111.

RUIMY R, BRISABOIS A, BERNEDE C, SKURNIK D, BARNAT S, ARLET G, MOMCILOVIC S, ELBAZ S, MOURY F, VIBET MA, COURVALIN P, GUIL-LEMOT D, ANDREMONT A. Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. *Environmental Microbiology*, 2010; 12(3): 608-615.

SALYERS AA, GUPTA A, WANG Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *TRENDS in Microbiology*, 2004; 12(9):412-416.

SCHJØRRING S, STRUVE C, KROGFELT KA. Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008; 62: 1086-1093.

SCHJØRRING S, KROGFELT KA. Assessment of Bacterial Antibiotic Resistance Transfer in the Gut. *International Journal of Microbiology*, 2011; 1-10.

SCHLOTER M, BARLAGE B. Antibiotika und Antibiotikaresistenzen. Helmholtz Zentrum München, FLUGS-Fachinformationsdienst, 2007. Internet: www.helmholtz-muenchen.de/flugs (Stand: 15.03.2013)

SCHRAUDER A, VONBERG R-P. ESBL-Bildner: Hintergrund, Epidemiologie und Konsequenzen. *Krankenhaushygiene up2date*, 2009; 4: 157-167.

SCHWAIGER K, HELMKE K, HÖLZEL CS, BAUER J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International Journal of Food Microbiology*, 2011; 148(3): 191-196.

SCHWARTZ T, KOHNEN W, JANSEN B, OBST U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 2003; 43: 325-335.

SHALE K, LUES JFR, VENTER P, BUYS EM. The distribution of *Staphylococcus sp* on bovine meat from abattoir deboning rooms. Food Microbiology, 2005; 22: 433-438.

SIMON A, GRÖGER N, ENGELHART S, MOLITOR G, EXNER M, BODE U, FLEISCHHACK G. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) – Übersicht zu Bedeutung, Prävention und Management in der Pädiatrie. Hygiene & Medizin, 2004; 259-275.

SLONCZEWSKI J L, FOSTER J W. Antimikrobielle Chemotherapie. In: Mikrobiologie Eine Wissenschaft mit Zukunft. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2012; 1197-1239.

SOHN MK, PECK KR, JOO EJ, HA YE, KANG CI, CHUNG DR, LEE NY, SONG JH. Duration of colonization and risk factors for prolonged carriage of vancomycin-resistant enterococci after discharge from the hospital. International Journal of Infectious Diseases, 2012; xxx.e1-xxx.7.

STEPANOVIĆ S, DIMITRIJEVIĆ V, VUKOVIĆ D, DAKIĆ I, SAVIĆ B, ŠVABIC-VLAHOVIĆ M. *Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs. Veterinary Microbiology, 2001; 82(2): 177-185.

STOCKWELL VO, DUFFY B. Use of antibiotics in plant agriculture. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 2012; 31 (1): 199-210.

STUART JC, van den MUNCKHOF T, VOETS G, SCHARRINGA J, FLUIT A, LEVERSTEIN-VAN HALL M. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. International Journal of Food Microbiology, 2012; 154: 212-214.

TOOMEY N, MONAGHAN A, FANNING S, BOLTON DJ. Assessment of anti-microbial resistance transfer between lactic acid bacteria and potential food-borne pathogens using in vitro methods and mating in a food matrix. Foodborne Pathogens and Disease, 2009; 6(8):925-933.

UMWELTBUNDESAMT: Antibiotika im Grundwasser. Wien; 2010.

Internet:

<http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/REP0258.pdf>

(Stand: 20.03.2013)

Van ELDERE J. The Significance of *in vitro* Antibiotic Resistance, 2005.

Internet: www.sbimc.org/2005/spring/slides/Vaneldere/Vaneldere.pdf

(Stand: 26.07.2013)

VARGA M, KUN KUNTOVÁ L, PANTŮČEK R, MAŠLAŇOVÁ I, RŮŽIČKOVÁ V, DOŠKAŘ J. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. FEMS Microbiology Letters, 2012; 332:146-152.

VERRAES C, van BOXSTAEL S, van MEERVENNE E, van COILLIE E, BUTAYE P, CATRY B, de SCHAETZEN M-A, van HUFFEL X, IMBERECHTS H, DIERICK K, DAUBE G, SAEGERMAN C, DE BLOCK J, DEWULF J, HERMAN L. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2013; 10: 2643-2669.

WALSH C, DUFFY G, NALLY P, O'MAHONY R, McDOWELL DA, FANNING S. Transfer of ampicillin resistance from Salmonella Typhimurium DT104 to Escherichia coli K12 in food. Letters in applied Microbiology, 2008; 46(2): 210-215.

WILLE B. Extended-spectrum- β -Lactamase bildende Bakterien (ESBL). Krankenhaushygiene und Infektionsverhütung, 2010; 32 Heft 2: 46-47.

WILLE B. Einsatz von Antibiotika aus mikrobiologischer Sicht (Teil 1). Krankenhaushygiene und Infektionsverhütung, 2007a; 29 Heft 2: 54-57.

WILLE B. Einsatz von Antibiotika aus mikrobiologischer Sicht (Teil 2). Krankenhaushygiene und Infektionsverhütung, 2007b; 29 Heft 4: 131-137.

WITTE W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000; 14: 321-325.

WITTE W, CUNY C. LA-MRSA bei Mensch und Tier. Robert Koch-Institut. Internet: <http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz> (Stand: 11.02.2013)

WITTE W, PFEIFER Y. ESBL-bildende Enterobacteriaceae bei Mensch und Tier. Robert Koch-Institut. Internet: <http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz> (Stand: 11.02.2013)

WOODFORD N, SUNDSFJORD A. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005; 56: 259-261.

WHO, World Health Organisation, Regional Office for Europe: Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. Copenhagen 2011. Internet: www.euro.who.int (Stand: 29.10.2012)

Anhang 1: Antibiogramm der Staphylokokken (mm Hemmhof)

	Erythro- mycin	Azithro- mycin	Ciprofloxacin	Doxycyclin	Tetracyclin	Ampicillin	Norfloxacin	Kanamycin	Gentamycin	Vancomycin	Penicillin G	Clindamycin	Cephazolin	Cefoxitin
<i>S. aureus</i>	0	0	24	14	18	14	9	21	20	18	17	13	0	27
<i>S. aureus</i>	0	0	24	13	15	11	0	22	19	23	26	9	12	18
<i>S. aureus</i>	0	0	25	14	18	16	9	22	20	20	18	16	0	28
<i>S. intermedius</i>	35	30	17	28	22	27	20	16	14	17	25	28	14	30
<i>S. sciuri</i>	30	28	29	31	15	18	35	27	26	24	16	18	16	16
<i>S. sciuri</i>	26	27	0	10	15	18	8	0	27	24	16	17	17	15
<i>S. sciuri</i>	28	27	27	25	15	15	24	26	23	24	17	14	17	15
<i>S. xylosus</i>	30	30	16	16	17	0	0	14	19	21	20	0	13	12
<i>S. xylosus</i>	30	30	18	17	17	20	0	13	14	18	20	19	11	20

Anhang 2: Antibiogramm der Enterobakterien (mm Hemmhof)

	Ciprofloxacin	Doxycyclin	Ampicillin	Tetracyclin	Norfloxacin	Kanamycin	Gentamycin	Streptomycin	Cephazolin	Cefoxitin
<i>E. aerogenes</i>	>30	24	0	25	>30	26	22	22	0	21
<i>E. aerogenes</i>	>30	28	0	>30	>30	30	27	28	0	24
<i>E. cloacae</i>	34	24	0	30	>30	24	24	24	0	19
<i>E. cloacae</i>	>30	24	0	29	33	27	24	26	0	21
<i>E. cloacae</i>	37	8	0	0	36	24	21	15	0	27
<i>E. coli</i>	15	11	0	0	13	25	25	10	0	25
<i>E. coli</i>	15	14	0	0	13	24	24	19	0	26
<i>E. coli</i>	15	14	0	9	14	25	24	18	0	26
<i>E. coli</i>	>30	14	0	16	>30	24	20	19	19	28
<i>E. coli</i>	>30	11	0	0	>30	24	22	20	0	23
<i>E. coli</i>	36	15	0	0	35	0	22	0	0	26
<i>E. coli</i>	0	19	0	21	0	23	21	17	0	24
<i>E. vulneris</i>	>30	18	0	0	30	28	26	0	0	>30
<i>E. vulneris</i>	>30	16	0	0	28	28	26	0	0	>30
<i>E. americana</i>	>30	22	0	23	>30	27	27	23	0	18
<i>K. pneumoniae</i>	>30	28	0	>30	>30	25	24	25	0	19
<i>K. pneumoniae</i>	>30	30	0	>30	>30	>30	>30	>30	0	25
<i>K. pneumoniae</i>	>30	19	0	21	>30	25	23	22	0	19
<i>K. pneumoniae</i>	>30	20	0	24	>30	28	24	24	0	25
<i>K. pneumoniae</i>	>30	26	0	25	>30	30	28	25	0	24
<i>K. pneumoniae</i>	33	19	0	20	33	23	20	22	0	23
<i>K. pneumoniae</i>	34	18	0	22	35	25	24	21	0	22
<i>K. pneumoniae</i>	>30	22	0	22	35	25	24	24	0	20

	Ciprofloxacin	Doxycycline	Ampicillin	Tetracycline	Norfloxacin	Kanamycin	Gentamycin	Streptomycin	Cephazolin	Cefoxitin
<i>K. pneumoniae</i>	>30	19	11	23	34	23	19	16	0	16
<i>sp. ozeanae</i>										
<i>K. pneumoniae</i>	30	19	0	23	34	24	20	20	0	23
<i>K. pneumoniae</i>	32	21	0	20	34	23	19	18	0	20
<i>K. pneumoniae</i>	30	18	0	21	30	22	19	19	0	20
<i>K. pneumoniae</i>	34	18	0	22	34	25	24	21	0	24
<i>K. pneumoniae</i>	34	17	0	19	31	24	22	20	0	23
<i>K. pneumoniae</i>	25	19	0	22	>30	24	22	19	0	20
<i>K. pneumoniae</i>	34	17	0	20	35	23	20	18	0	21
<i>K. pneumoniae</i>	35	17	0	20	35	24	20	19	0	21
<i>K. pneumoniae</i>	>30	19	0	23	30	25	20	20	0	22
<i>K. pneumoniae</i>	30	18	0	21	30	22	20	18	0	21
<i>Pantoea spp 2</i>	>30	23	0	26	>30	24	20	25	0	21
<i>Pantoea spp 2</i>	>30	24	0	31	>30	28	24	22	0	20
<i>Pantoea spp 2</i>	>30	23	0	25	>30	25	23	19	0	25
<i>Pantoea spp 3</i>	>30	23	0	23	>30	24	22	20	0	25
<i>S. plymuthica</i>	34	0	0	27	32	26	20	20	0	22
<i>S. plymuthica</i>	35	21	0	24	30	27	24	23	0	22
<i>S. rubidaea</i>	>30	24	0	23	>30	27	25	23	0	22

LEBENS LAUF

Sofia Viktoria Wanner

Schulbildung:

1994 – 1998	Volksschule Pradl, Innsbruck
1998 – 2002	Privat-Hauptschule Kettenbrücke, Innsbruck
2002 – 2007	Höhere Bundeslehranstalt für wirtschaftliche Berufe, Innsbruck Schwerpunkt: Ernährung und Betriebswirtschaft

Berufsausbildung:

2007 – 2011	Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften, Universität Wien
Seit März 2011	Masterstudium er Ernährungswissenschaften, Universität Wien Schwerpunkt: Lebensmittelsicherheit und -qualität

Berufserfahrung:

August 2011	Praktikum Mikrobiologie, AGES Innsbruck
Juli-August 2012	Praktikum mikrobiologisches und chemisches Labor, Tirol Milch Standort: Wörgl
Dezember 2012	Tutorium Übungen zur Mikrobiologie, Universität Wien