



Ines Wyrsch¹

Resistente Enterokokken in Trinkwasser und Eis als Zusatz zu Speisen oder Getränken

Enterokokken werden ubiquitär im Erdreich, Wasser und auf Nahrungsmitteln gefunden. Sie gehören zur natürlichen Bakterienflora des Magen-Darm-Traktes von Mensch und Tier, und im Trinkwasser weisen sie als Fäkalindikatoren auf eine fäkale Verunreinigung hin.

Im letzten Jahrzehnt haben Enterokokken als Ursache nosokomialer Infektionen, z. B. Harnwegs- und Wundinfektionen, Sepsis und Endocarditis, zunehmend an Bedeutung gewonnen [1]. Von medizinischer Bedeutung sind insbesondere Enterococcus (E.) faecalis und E. faecium, welche häufig resistent gegenüber Glycopeptid-Antibiotika wie z. B. Vancomycin sind. Neben dem Besitz intrinsischer Resistenzeigenschaften zeigen Enterokokken die Fähigkeit, Antibiotikaresistenzen per Mutation bzw. Neuerwerb von DNA zu akquirieren. Besonders bei E.-faecium-Stämmen findet man häufig eine Akkumulation mehrerer Resistenzmechanismen (intrinsisch und erworben) und damit die Ausprägung multiresistenter Stämme.

Resistenzen und deren Gründe

Vancomycin-Resistenz kann durch mehrere Gene vermittelt werden. Verursacher nosokomialer Infekt sind hauptsächlich VanA- und VanB-Phänotypen. Der VanC-Phänotyp ist in Europa gehäuft, jedoch werden invasive Infektionen mit VanC-resistenten Enterokokken kaum beobachtet. Im Gegensatz zu den erworbenen VanA- und VanB-Resistenzen ist die VanC-vermittelte Resistenz intrinsisch, also chromosomal, und kommt in erster Linie bei *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* vor [2]. Für die Entstehung und den Anstieg von Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken wird neben der verbreiteten Verwendung von Antibiotika in der Humanmedizin auch der Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen in der Nutztierhaltung verantwortlich gemacht.

In den letzten Jahren kam es zu grössten Ausbrüchen von VRE, und die Anzahl nachgewiesener Fälle in der Schweiz hat sich in den letzten vier Jahren rund versechsfacht. Seit 2018 wird eine Häufung von mit VRE infizierten Patienten in der Schweiz dokumentiert [3]. Aufgrund mangelnder therapeutischer Alternativen ist das zunehmende Auftreten von VRE besorgniserregend, und eine rasche Erkennung ist von grosser Bedeutung. Kürzlich wurde den Enterokokken ein weiteres, potenziell gesundheitsge-

fährdendes Merkmal zugeschrieben. Amerikanische Wissenschaftler identifizierten ein Homolog des Genclusters *Clostridium (C.) botulinum* Neurotoxin im Genom eines *E.-faecium*-Stammes [4–6]. Neurotoxine von *C. botulinum* (BoNTs) induzieren Botulismus, eine seltene, aber schwere Erkrankung. Das neu entdeckte Enterokokken-Botulinum-Neurotoxin-like Toxin (BoNT/En) enthält alle für typische Neurotoxine charakteristischen funktionellen Domänen und könnte theoretisch ebenfalls Botulismus verursachen. Daten zur effektiven Vorkommensrate von BoNT/En gibt es aber bisher keine.

Untersuchungsziele

Da 6% aller seit 2016 im Aargau auf Enterokokken untersuchten Wasserproben inklusive Eis positiv für Enterokokken waren, ist Wasser als mögliche Verbreitungsmatrix für VRE und BoNT/En in Betracht zu ziehen. Zur Risikoabschätzung über die Belastung von Schweizer Trinkwasser mit Vancomycin-resistenten und BoNT/En-enthaltenden Enterokokken wurden im Rahmen einer gemeinsamen Kampagne unter Federführung des Amtes für Verbraucherschutz Aargau (AVS AG) aus Trinkwasser oder Eis isolierte *E. spp.* gleichzeitig auf deren Vancomycin-Resistenz und die Präsenz von BoNT/En getestet.

Bis anhin gibt es in der Schweiz noch keine gesetzlichen Grundlagen für VRE. Die gesetzlichen Grundlagen für Enterokokken in Wasser sind für Trinkwasser und Eis: 0 KBE/100 ml (Art. 3

Abs. 2 TBDV des EDI vom 16. Dezember 2016, Stand 1. Mai 2018).

Proben und deren Prüfung

Von März bis Ende August 2019 wurden alle Enterokokkenkolonien, die aus routinemässig auf Enterokokken untersuchten Wasser- und/oder Eiswürfelproben aus Trinkwasserversorgungen bzw. Verpflegungsbetrieben isoliert wurden (angesetzt gemäss ISO 7899-2:2000 oder gegenüber dieser ISO validierten Methoden), ans AVS AG geschickt. Die eingeschickten *E.-spp.*-Kolonien wurden auf Compass Enterococcus Agar (CEA, Biokar) überimpft und bei 37°C während 24 ± 2 h aerob bebrütet. Befanden sich auf dem Filter weniger als 10 Kolonien, wurden sie alle subkultiviert. Befanden sich auf dem Filter mehr als 10 Kolonien, wurden nur 10 isoliert. Später wurden aufgrund von Kapazitätsengpässen nur noch 5 Kolonien subkultiviert.

Zur Überprüfung der Vancomycin-Resistenz wurden die Stämme vom CEA Agar auf Brilliance VRE Agar (Oxoid) überimpft und bei 37°C während 24 ± 2 h aerob bebrütet. Aus Stämmen, die Wachstum auf VRE Agar zeigten, wurde DNA isoliert und mittels Multiplex-PCR auf das Vorhandensein der VanA-, VanB- und VanC-R Resistenzgene analysiert (Anyplex VanR Real-time Detection Kit, Seegene).

Alle isolierten Stämme wurden zudem mittels einer auf eine spezifische Sequenz des BoNT/En-Gens gerichteten real-time PCR «gescreent» (entwickelt von Microsynth im Auftrag des BLV).

¹ Dr. Ines Wyrsch, Leiterin Sektion Mikrobiologie, Amt für Verbraucherschutz, Lebensmittelkontrolle, Aarau

Ergebnisse

Von den eingetroffenen 336 Proben der Kantone AG, BL, FR, GR, LU, SG, SO, TG, TI, UR, ZG und ZH enthielten 284 Proben weniger als oder 10 Enterokokken Kolonien pro Filter: 41 Proben enthielten 11 bis 100 und 11 Proben mehr als 100 Kolonien. Nicht alle Proben enthielten subkultivierbare Kolonien. Für die weiteren Analysen wurden insgesamt 933 Kolonien von 306 Proben aus 11 Kantonen verwendet. Von den 933 Kolonien zeigten 445 (48%) aus 203 Proben (66%) leichtes bis starkes Wachstum auf VRE Agar. Gemäss Rücksprache mit anderen klinischen Laboratorien handelte es sich bei dieser Beobachtung um ein bereits mehrfach beobachtetes Artefakt, das auf die Verwendung von zu viel Bakterienmaterial zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Unspezifität wurden alle Enterokokkenisolate, die Wachstum auf VRE Agar zeigten, mit PCR analysiert. Alle 445 Isolate waren negativ für die

VanA- und VanB-Resistenzgene. Bei 36 Isolaten wurde ein positives PCR-Signal für VanC detektiert. Die Isolate stammten aus 8 Kantonen. Es wurde keine erhöhte regionale Prävalenz beobachtet. VanC-Phänotypen gehören jedoch nicht zu den Ausbruchstämmen, und durch VanC-Enterokokken verursachte Infektionen sind selten. In keinem der 933 analysierten E.-spp.-Isolate wurde ein positives PCR-Signal für die BoNT/En-spezifische Sequenz nachgewiesen. Zusammenfassend kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass mit E. spp. kontaminiertes Trinkwasser gegenwärtig kein relevantes Risiko für VRE-Infektionen und Botulismusfälle darstellt.

Korrespondenz
ines.wyrsch@ag.ch

Referenzen

1. R.C. Spencer: Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. EJCMI 1996
2. Maja Weisser, Andreas F. Widmer: Multiresistente Enterokokken. Schweiz Med Forum 2012
3. N. Buetti et al.: Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Switzerland: a Nation-Wide Survey; Swissnoso 2018
4. Brunt et al.: Identification of a novel botulinum neurotoxin gene cluster in Enterococcus. FEBS Letters 2018
5. Zhang et al.: Identification of a Botulinum Neurotoxin-like Toxin in a Commensal Strain of Enterococcus faecium. CHM 2018
6. Williamson et al.: Botulinum-neurotoxin-like sequences identified from an Enterococcus sp. genome assembly. bioRxiv 2017

Entérocoques résistants dans l'eau potable et dans la glace utilisé comme additif dans les nurritures ou les boissons

Les entérocoques sont ubiquitaires dans la terre, l'eau et sur les aliments. Ils font partie de la flore bactérienne naturelle du tractus gastro-intestinal de l'être humain et de l'animal. Considérés comme des indicateurs fécaux, leur détection dans l'eau potable signale une contamination fécale. Au siècle dernier, les entérocoques sont devenus une cause de plus en plus importante d'infections nosocomiales (infections urinaires, infections des plaies, septicémies et endocardites, p. ex.) [1]. Les entérocoques significatifs en médecine sont en particulier *Enterococcus (E.) faecalis* et *E. faecium*, qui sont souvent résistants aux antibiotiques de la famille des glycopeptides comme la vancomycine. La résistance à la vancomycine peut être due à plusieurs gènes. Les entérocoques responsables d'infections nosocomiales sont principalement des phénotypes VanA et VanB. Il y a peu, une autre propriété potentiellement dangereuse pour la santé a été attribuée aux entérocoques. Identifiée récemment dans une souche d'entérocoques, la toxine appelée «Botulinum Neurotoxin-like Toxin» ou BoNT/En, en anglais, contient tous les domaines fonctionnels caractéristiques des neurotoxines typiques et pourrait en théorie aussi être source de botulisme. Au total, 6% des échantillons d'eau analysés depuis 2016 (ce qui comprend aussi des échantillons de glace) en Argovie étaient positifs aux entérocoques. Par conséquent, l'eau doit être envisagée comme une source potentielle de propagation d'entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) et de BoNT/En. Afin d'évaluer le risque associé à la contamination de l'eau potable suisse aux entérocoques renfermant la BoNT/En et résistants à la vancomycine, les souches d'entérocoques isolées dans l'eau potable ou la glace ont fait l'objet d'analyses visant à tester leur résistance à la vancomycine et à déterminer la présence de BoNT/En dans le cadre d'une campagne commune menée sous l'égide de l'Office de protection des consommateurs d'Argovie (AVS AG). L'ADN des souches pour lesquelles une croissance a été constatée sur un milieu à base d'agar destiné à la détection d'ERV a été isolé, puis soumis à une analyse PCR multiplex pour détecter la présence des gènes VanA, VanB et VanC responsables de résistances (Anyplex VanR real-time Detection Kit, Seegene).

Toutes les souches isolées ont par ailleurs fait l'objet d'une analyse PCR en temps réel ciblant une séquence spécifique du gène codant pour la BoNT/En (test développé par Microsynth sur mandat de l'OSAV).

Sur les 933 colonies, 445 (48%) provenant de 203 échantillons (66%) ont donné lieu à une croissance légère à forte sur le milieu à base d'agar. En revanche, aucun des 445 isolats ne présentait les gènes VanA et VanB responsables de résistances. De plus, aucun signal PCR positif pour la séquence spécifique à la BoNT/En n'a été détecté pour les 933 isolats de souches d'entérocoques analysés. En résumé, on peut en conclure que l'eau potable contaminée par des entérocoques n'est pas associée à ce jour à un risque significatif d'infections à ERV et de botulisme.