

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

in Kooperation mit dem  
Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart

**Untersuchungen zum Vorkommen von  
Methicillin- resistenten Staphylokokken (MRS)  
und Vancomycin- resistenten Enterokokken (VRE)  
in Putenmastbetrieben**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Agnes Richter  
Tierärztin  
aus Memmingen

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3514

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

methicillin-resistent Staphylococcus aureus, vancomycin-resistent enterococci,  
Enterococcus, Staphylococcus, Turkey, antibiotics, zoonoses

Tag der Promotion: 18.10.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-068-3

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

# Inhaltsverzeichnis

## 2 LITERATURÜBERSICHT ..... 13

### 2.1 Staphylokokken und Methicillin-resistente

#### Staphylokokken (MRS) ..... 13

2.1.1 Vorkommen und Bedeutung von Staphylokokken.....	13
2.1.2 Antibiotikaresistenzen von Staphylokokken .....	16
2.1.2.1 Resistenzmechanismen.....	16
2.1.2.2 Resistenzevolution.....	17
2.1.3 Nachweis von MRS .....	18
2.1.3.1 Isolierung, Identifizierung .....	18
2.1.3.2 Nachweis des <i>mecA</i> -Resistenzgens .....	20
2.1.3.3 Molekulare Typisierung.....	21
2.1.4 Vorkommen und Bedeutung von MRS.....	23
2.1.4.1 MRS bei Menschen .....	23
2.1.4.2 MRS bei Tieren.....	25
2.1.4.2.1 MRS bei Nutztieren.....	26
2.1.4.2.2 MRS bei Haus- und Heimtieren .....	31
2.1.4.3 Bedeutung von MRS als Zoonoseerreger .....	32

### 2.2 Enterokokken und Vancomycin-resistente

#### Enterokokken (VRE)..... 34

2.2.1 Vorkommen und Bedeutung von Enterokokken.....	34
2.2.2 Antibiotikaresistenzen von Enterokokken.....	36
2.2.2.1 Resistenzmechanismus .....	37
2.2.2.2 Resistenzevolution und Epidemiologie.....	41
2.2.3 Nachweis von VRE .....	42
2.2.3.1 Isolierung, Identifizierung und Nachweis der <i>van</i> -Resistenzgene.....	42
2.2.4 Vorkommen und Bedeutung von VRE .....	43
2.2.4.1 VRE bei Menschen.....	43
2.2.4.2 VRE bei Tieren .....	45

2.2.4.2.1 VRE bei Nutztieren .....	45
2.2.4.2.2 VRE bei Haustieren .....	48
2.2.4.3 Bedeutung von VRE als Zoonoseerreger .....	48
<b>3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Material MRS und VRE .....</b>	<b>50</b>
3.1.1 Untersuchte Betriebe und Tierhalter .....	50
3.1.2 Probenmaterial .....	50
3.1.3 Fragebogen .....	50
3.1.4 Statistik.....	51
<b>3.2 Material MRS .....</b>	<b>51</b>
3.2.1 Material für die mikrobiologische Untersuchung von Feldproben .....	51
3.2.1.1 Bakterienkulturen.....	51
3.2.1.2 Stammerhaltung und Kultivierung .....	51
3.2.1.3 Nährmedien und Reagenzien .....	52
3.2.1.4 Materialien .....	52
3.2.1.5 Geräte und Computerprogramme .....	53
3.2.2 Material für den molekularbiologischen Nachweis von Resistenzgenen mittels Real-Time PCR.....	55
3.2.2.1 Reagenzien und Lösungen für die Real-Time PCR.....	55
3.2.2.2 Geräte und Computerprogramme .....	56
<b>3.3 Material VRE .....</b>	<b>57</b>
3.3.1 Material für die mikrobiologische Untersuchungen von Feldproben .....	57
3.3.1.1 Bakterienkulturen.....	57
3.3.1.2 Stammerhaltung und Kultivierung .....	57
3.3.1.3 Nährmedien und Reagenzien .....	58
3.3.1.4 Materialien .....	59
3.3.1.5 Geräte und Computerprogramme .....	59
3.3.2 Material für den molekularbiologischen Nachweis von Resistenzgenen mittels Real-Time PCR.....	59

3.3.2.1 Reagenzien und Lösungen für die Real-Time PCR.....	59
<b>3.4 Methode MRS und VRE.....</b>	<b>60</b>
3.4.1 Probennahme in den Betrieben .....	60
3.4.2 Probennahme bei den Personen .....	61
<b>3.5 Methode MRS.....</b>	<b>61</b>
3.5.1 Vorversuche zur Entwicklung der Real-Time PCR-Tests .....	61
3.5.2 Mikrobiologische Untersuchungen von Feldproben.....	65
3.5.2.1 Isolierung .....	65
3.5.2.2 Charakterisierung des <i>mecA</i> -Resistenzgens mittels Real-Time PCR.....	66
3.5.2.3 Identifizierung mittels FT-IR .....	67
3.5.2.4 Molekulare Typisierung.....	68
<b>3.6 Methode VRE .....</b>	<b>70</b>
3.6.1 Vorversuche zur Entwicklung der Real-Time PCR-Tests .....	70
3.6.2 Mikrobiologische Untersuchungen von Feldproben.....	74
3.6.2.1 Isolierung .....	74
3.6.2.2 Identifizierung mittels biochemischen Eigenschaften .....	75
3.6.2.3 Charakterisierung der <i>van</i> -Resistenzgene mittels Real-Time PCR .....	77
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>79</b>
<b>4.1 Ergebnisse MRS .....</b>	<b>79</b>
4.1.1 Ergebnisse der Vorversuche zur Entwicklung der Real-Time PCR-Tests .....	79
4.1.2 Ergebnisse der Isolierung .....	81
4.1.3 Ergebnisse der Charakterisierung des <i>mecA</i> -Resistenzgenes mittels Real-Time PCR .....	81
4.1.4 Ergebnisse der Identifizierung mittels FT-IR .....	83
4.1.5 Ergebnisse der Betriebe .....	85
4.1.6 Ergebnisse der beprobten Personen.....	121
4.1.7 Ergebnisse der molekularen Typisierung .....	123
<b>4.2 Ergebnisse VRE.....</b>	<b>129</b>

4.2.1 Ergebnisse der Vorversuche zur Entwicklung der Real-Time PCR-Tests .....	129
4.2.2 Ergebnisse der Isolierung .....	132
4.2.3 Ergebnisse der Identifizierung.....	132
4.2.4 Ergebnisse der Charakterisierung der <i>van</i> -Resistenzgene .....	132
4.2.5 Ergebnisse der Betriebe und der beprobten Personen .....	135
<b>5 DISKUSSION.....</b>	<b>138</b>
<b>5.1. Diskussion des Nachweisverfahrens und der Ergebnisse von MRS bei Mastputen, in Mastputenställen und bei Personen .....</b>	<b>138</b>
<b>5.2 Diskussion des Nachweisverfahrens und der Ergebnisse von VRE bei Mastputen, in Mastputenställen und bei Personen .....</b>	<b>149</b>
<b>6 SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>156</b>
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>158</b>
<b>8 SUMMARY .....</b>	<b>160</b>
<b>9 ANHANG .....</b>	<b>162</b>
<b>10 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>181</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AFP	Amplifield-Fragment Length Polymorphism
<i>arcC</i>	MLST-Locus (carbamate kinase)
<i>aroE</i>	MLST-Locus (shikimate dehydrogenase)
ATCC	American Type Culture Collection
AVV	Allgemeine Verwaltungsvorschrift
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
caMRSA	in der Bevölkerung auftretende MRSA (community acquired)
CASO-Bouillon	Caseinpepton-Sojapepton-Bouillon
CATC-Agar	Citrat-Azid-Tween-Carbonat-Agar
CC	Klonaler Komplex (clonal complex)
CVUA	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt
D-Ala-D-Ala	D-Alanyl-D-Alanin
D-Ala-D-Lak	D-Alanin-D-Laktat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
Entsch.	Entscheidung
ESBL	extended spectrum $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
EU	Europäische Union
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
g	Gramm
G	Guanin
<i>glpF</i>	MLST-Locus (glycerol kinase)
<i>gmk</i>	MLST-Locus (guanylate kinase)
GRE	Glycopeptid-resistente Enterokokken

h	hora (Stunde)
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
haMRSA	Krankenhaus adaptierte MRSA (hospital acquired)
hcaMRSA	MRSA-Stämme die in einer stationären Einrichtung erworben werden und durch Patienten wieder in Krankenhäuser zurückgebracht werden (health care associated)
HCL	Salzsäure
IR	Infrarot
KAA-Agar	Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar
Kbp	Kilobasenpaare
Kg	Kilogramm
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
l	Liter
LAP	Leucin-Aminopeptidase
laMRSA	livestock-associated MRSA
LGA	Landesgesundheitsamt
<i>mecA</i>	Methicillin-Resistenzgen
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
min.	Minuten
ml	Milliliter
mmol/l	Millimol pro Liter
MLST	Multi-Locus-Sequenz-Typ
MRKNS	Methicillin-resistente Koagulase-negative Staphylokokken
MRSASA	Methicillin-resistente Staphylokokken ausgenommen <i>S. aureus</i>
MRSA	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensible <i>S. aureus</i>
n	Stichprobenumfang
n.a.	nicht angegeben
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nr.	Nummer
n.t.	nicht typisierbar
NT-MRSA	nicht typisierbare MRSA (non-typeable MRSA)
o.ä.	oder ähnliches
ORF	open reading frame



PBP	Penicillin-Bindeprotein
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	Potentium hydrogenii
<i>pta</i>	MLST-Locus (phosphate acetyltransferase)
PYR	Pyrrolidonyl-Peptidase
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus/Streptococcus</i>
SCC <i>mec</i>	Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>
sec.	Sekunden
SIM	Schwefelwasserstoff-Indol-Motilität
smaI	PFGE-Restriktionsenzym für <i>S. aureus</i>
spp.	Spezies
<i>spa</i>	Protein A-kodierendes Gen von <i>S. aureus</i>
SSSS	Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrome
ST	Sequenztyp in der MLST
T	Thymin
t	<i>spa</i> -Sequenz-Typ
Tab.	Tabelle
<i>tpi</i>	MLST-Locus (triosephospate isomerase)
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Toxic-Shock-Syndrom
TSST	Toxic-Shock-Syndrom-Toxin
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
VAAREF	Vancomycin-, Ampicillin- und Aminoglycosid- resistente <i>Enterococcus faecium</i>
<i>vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL,</i>	Vancomycin-Resistenzgene (A, B, C, D, E, G, L)
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VREF	Vancomycin-resistente <i>E. faecium</i>
WHO	World Health Organization
<i>ygil</i>	MLST-Locus (acetyl coenzyme A acetyltransferase)

z.B.	zum Beispiel
ZnSe	Zinkselenid
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μM	Mikromol

# 1 Einleitung

Ein Meilenstein in der Bekämpfung bakterieller Infektion ist die Entdeckung von Antibiotika. Während nach dem 2. Weltkrieg in den 1950er und 1960er zahlreiche Antibiotika verschiedener Klassen mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen entdeckt und entwickelt wurden, wird die Suche nach neuartigen Chemotherapeutika immer schwieriger und aufwändiger. So hat seit den 1980er Jahren bis heute die Entwicklung neuer Antibiotika um mehr als ein Drittel abgenommen und nur wenige echte Innovationen, deren Wirksamkeit auf neuen Wirkungsmechanismen beruhen, sind hinzugekommen (Holzgrabe, 2010). Grund zur Sorge bereitet in diesem Kontext außerdem die Zunahme multiresistenter Keime in den letzten 10 bis 20 Jahren, die sich in und zwischen Krankenhäusern ausbreiten können (GERMAP, 2008). Diese zunehmend besorgniserregende Situation (EFSA, 2010; AHO, 2010b) hat nicht nur die Diskussion um den Einsatz von Antibiotika in der Humanmedizin in die Öffentlichkeit gerückt, sondern gibt auch in der Nutztiermedizin Anlass zu Appellen und Maßnahmen, antibakterielle Chemotherapeutika vernünftig und verantwortungsvoll sowie in geringeren Mengen einzusetzen (AHO, 2010a, b, c; BTK/AGTAM, 2010; FVE, 1999).

Zu den derzeit häufigsten nosokomialen, multiresistenten Infektionserreger sind Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*- (MRSA) und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) zu zählen (Heudorf und Tessman, 2008). Auch bei Tieren wurde in den letzten Jahren verstärkt über das Auftreten von MRSA und VRE als Besiedler und Infektionserreger berichtet (Ellerbroek et al, 2004; Cuny et al., 2009; Leonard und Markey, 2008, Frick, 2010; Spohr et al., 2010; Dullweber, 2010). Vor allem bei Schweinen gibt es hinsichtlich der MRSA-Prävalenz zahlreiche aktuelle Untersuchungsergebnisse (Tenhagen et al., 2009). Aber auch bei Kühen (Joo et al., 2001; Lee, 2006; Spohr et al., 2010), Pferden (Cuny et al., 2009; Walther et al., 2009) und bei Kleintieren (Walther, 2007) konnten MRSA-Keime nachgewiesen werden. Hingegen gibt es gegenwärtig nur vereinzelt Berichte über MRSA-Nachweise aus Geflügelbeständen und Angaben über deren Prävalenz fehlen vollständig (Fetsch et al., 2009a; Tenhagen et al., 2009).

Bei VRE-Keime konzentrieren sich die meisten Studien auf eine mögliche Ausbreitung von VRE aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung über die Nahrungskette auf den Menschen, da der Einsatz von Avoparcin als Leistungsförderer in der Schweine-, Hühner- und Putenmast möglicherweise zur Entwicklung von Kreuzresistenzen bei Enterokokken gegen Vancomycin und Teicoplanin geführt hat.

MRSA- wie auch VRE-Keime können sowohl beim Menschen als auch beim Tier nachgewiesen werden (Descheemaeker et al., 1999; Frick, 2010). Vor allem bei **MRSA** ist sich die Fachwelt einig, dass es sich hierbei um einen **Zoonoseerreger** handelt. Im Falle von VRE hingegen sind die Übertragungswege vom Tier auf den Menschen noch nicht

geklärt. Somit sind Untersuchungen von Tieren sowie von Personen mit Tierkontakt als Basis einer Risikoabschätzung zur Übertragung von multiresistenten Keimen auf den Menschen grundlegend.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, erstmals die Prävalenz von MRS und VRE in Mastputenbeständen sowie deren Verbreitung unter putenhaltenden Landwirten und ihren Familienmitgliedern zu ermitteln. Dazu werden bereits bewährte Nachweismethoden eingesetzt, mit deren Hilfe eine große Probenanzahl von Mastputen, Stallstaub und Personen bearbeitet und deren Ergebnisse mit denen europaweiter Prävalenzstudien bei anderen Tierarten verglichen werden können.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Staphylokokken und Methicillin-resistente Staphylokokken (MRS)

#### 2.1.1 Vorkommen und Bedeutung von Staphylokokken

Nach Angaben von Newsom (2008) gehen die ersten Arbeiten über Staphylokokken auf den schottischen Chirurgen Ogston im Jahre 1883 zurück. Er wies traubenförmig angeordnete Kokken in Eiterprozessen nach und gab diesen Mikroorganismen deshalb den Namen *Staphylococcus*.

Die Gattung *Staphylococcus* (*S.*) gehört heute zur Familie der *Staphylococcaceae* und wird zusammen mit den Familien *Bacillaceae*, *Planococcaceae* und *Listeriaceae* sowie fünf weiteren Familien in die Ordnung *Bacillales*, Stamm *Firmicutes* eingegliedert (Becker und Peters, 2009).

Staphylokokken sind grampositive, nichtbewegliche, Katalase-positive Kokken. Sie weisen einen Durchmesser von 0.5-1.5 µm auf, wachsen in der Regel fakultativ anaerob und bilden keine Sporen. Staphylokokken können einzeln, in Paaren, Tetraden, kurzen Ketten oder aber in der namensgebenden typischen Traubenform auftreten (Kloos und Schleifer, 1986; Selbitz, 2007). Die Gattung *Staphylococcus* enthält mehr als 60 Spezies und Subspezies ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de); Mai 2010).

Pathogene Staphylokokken besitzen an die Zelloberfläche gebundene Virulenzfaktoren wie eine antiphagocytäre Schleimhülle (Kapselpolysaccharid), eine Glykokalix, fibronektinbindende Proteine, das Protein A (Immunglobulin-Rezeptor), Enzyme (Proteasen, Lipasen, Nukleasen, Hyaluronidasen) und den Clumping-Faktor. Der Clumping-Faktor enthält Fibrinogenrezeptoren (zellgebundene Koagulase) und löst die Verklumpung der Bakterien im Blutplasma aus. Ein für die Virulenz von Staphylokokken wichtiges extrazelluläres Enzym ist die Koagulase. Koagulase ist im Gegensatz zum Clumping-Faktor nicht zellgebunden und führt zu sichtbaren Verklumpungen der Bakterien, indem es das Fibrinogen im Plasma zu Fibrin umwandelt (Selbitz, 2007). Die Einteilung von Staphylokokken in Koagulase-positiv- und Koagulase-negative Arten, die J. von Daranyi bereits 1926 begründet wurde, ist nach dem heutigen Wissen molekulargenetisch nicht untermauert und lässt auch keine eindeutige Abtrennung in pathogene und apathogene Spezies zu. Diese Einteilung wird aber dennoch aus Gründen der bakteriologisch-diagnostischen Praktikabilität und zumindest teilweiser klinischen Relevanz auch heute noch angewandt (Becker und Peters, 2009; Hof und Dörries, 2005).

Pathogene Staphylokokken bilden Toxine wie pyrogene Toxine (Toxic-Shock-Syndrome-Toxins-1 [TSST-1], das das sog. Toxic Shock Syndrome [TSS] hervorruft) und Enterotoxine mit Superantigenaktivität (die Durchfall und Erbrechen auslösen können), epidermiolytische Toxine (Proteasen, exfoliative Toxine ETA und ETB, die die Epidermis massiv schädigen), sowie Leukozidine und Hämolsine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), die extrazellulär abgegeben werden und toxinvermittelte Krankheitsbilder auslösen können (Becker und Peters, 2009).

#### Vorkommen beim Tier

Staphylokokken gehören zu den gewöhnlichen Besiedlern der Haut von Tieren (Nagase et al., 2002). Besondere Bedeutung kommt *S. aureus* bei Tieren und Menschen zu, da *S. aureus* einer der häufigsten Erreger von eitrigen Entzündungen äußerer und innerer Organe ist. Diese Entzündungen können örtlich begrenzt sein, flächenhafte Ausdehnung erlangen oder in einer Septikämie mit schwerem Krankheitsverlauf gipfeln (Mayr et al., 1984).

Zu den bekanntesten Staphylokokken-Infektionen bei Tieren gehören die exudative Epidermitis der Schweine („Ferkelruß“) und die mit hohen wirtschaftlichen Verlusten einhergehenden Mastitiden der Rinder und kleinen Wiederkäuern. Bei allen Tierarten können Hautinfektionen mit Ausbildungen von Pusteln, Akne, Furunkeln und Pyodermien, Otitis externa und media, die Botryomykose sowie Septikämien, die mit hohem Fieber einhergehen, vorkommen (Lécuyer, 1967; Weigt und Grunert, 1984; Rich, 2005; Selbitz, 2007).

Staphylokokken sind auch beim Geflügel ubiquitär verbreitet und bei gesunden Tieren als Kommensalen auf der Haut, Schleimhaut und den Federn nachgewiesen worden. *S. aureus*-Infektionen treten aber ebenfalls beim Wirtschaftsgeflügel wie Hühnern und Puten auf. Die Krankheitsprozesse können dabei bei Puten aller Altersstufen als akute Septikämie oder aber örtlich begrenzt verlaufen (Hafez und Jodas, 1997). Am verbreitetsten sind dabei erhöhte Embryosterblichkeit, Nabel- und Dottersackentzündung, Septikämie, Arthritis, Synovitis, Otitis und Dermatitis, wie z.B. Pododermatitis („bumble foot“). Neben der horizontalen Übertragung von Staphylokokken durch direkten aber auch indirekten Kontakt über Vektoren, ist bei Geflügel auch die vertikale Übertragung nachgewiesen, so dass man *S. aureus* beim frisch geschlüpften Küken finden kann (Hummel und Witte, 1978; Hafez und Jodas, 1997; Aarestrup et al., 1999; Selbitz, 2007).

Bei Puten konnten Aarestrup et al. (1999) verschiedene Staphylokokken-Isolate aus klinischen Proben isolieren. Die meisten der Isolate erwiesen sich als *S. aureus*, gefolgt von *S. hyicus*, *S. xylosum*, *S. saprophyticum* und *S. cohnii*.

Auf die für die Tiermedizin besonders wichtigen Koagulase-positiven Staphylokokken *S. intermedius* und *S. pseudintermedius* sowie die Koagulase-negativen oder schwach positive Spezies *S. hyicus* als Infektionserreger bei Tieren gehen speziell Devriese et al. (2005) ein.

#### Vorkommen beim Menschen

Bei gesunden Menschen können Staphylokokken als natürliche Besiedler der Haut nachgewiesen werden. Personen, die mit *S. aureus* kolonisiert sind, haben allerdings ein erhöhtes Risiko späterer Infektionen. *S. aureus*-Infektionen sind eine der Hauptursachen für Haut-, Weichteil-, Atemwegs-, Knochen-, Gelenk- und Endovaskulärerkrankungen. Die Erkrankungen gehen meistens mit Fieber einher und können unbehandelt zum Tod führen. Aufgrund dieser Gegebenheiten muss bei einem Nachweis von *S. aureus* zwischen einer Kolonisation ohne klinischen Erscheinungen und einer Infektion mit klinischen Erscheinungen unterschieden werden. Die Kolonisation ist zwar die Voraussetzung für eine Infektion, muss aber nicht zwangsläufig zu einer Infektion führen (Lamikanra et al., 1985; Marples et al., 1990; Nagase et al., 2002; Hof und Dörries, 2005; Stock, 2007; Becker und Peters, 2009).

Bei immunsupprimierten Patienten, Patienten mit Drogenkonsum, älteren Patienten, Patienten mit künstlichen Herzklappen oder stationär behandelten Patienten besteht ein erhöhtes Risiko einer systemischen *S. aureus*-Infektion (Lowy, 1998).

Die enorme Bedeutung Koagulase-negativer Staphylokokken (KNS) als Krankheitserreger vor allem nosokomialer, aber auch allgemein erworbener Infektionen, wurde erst in den letzten Jahrzehnten erkannt. Schwere und fulminant verlaufende Erkrankungen werden insbesondere bei alten Menschen, Kleinkindern und Neugeborenen beobachtet (Stock, 2007). Die medizinische Bedeutung von KNS resultiert unter anderem aus der ausgeprägten Fähigkeit, Kunststoffoberflächen zu besiedeln und dadurch fremdkörperassoziierte Infektionen zu verursachen. Der in der modernen Medizin stark zunehmende Einsatz von Geräten wie Venenkatheter, Liquorshunts, künstlichen Herzklappen sowie Gelenk- und Gefäßprothesen brachte deswegen einen rasanten Anstieg der Häufigkeit nosokomialer Septikämien und fremdkörper-assoziiertes Infektionen durch KNS mit sich (Stock, 2007; Becker und Peters, 2009).

Bestimmte *S. aureus*-Stämme sind in der Lage, pathogenetisch bedeutsame Toxine zu synthetisieren und extrazellulär abzugeben. Dadurch kann es zu toxinvermittelten Krankheitsbildern wie das Staphylococcal Scaled Skin Syndrom (SSSS), das Toxic Shock Syndrom (TSS) und die Gastrointestinale Toxikose kommen. Das SSSS beim Menschen ist eine Erkrankung der Haut, die durch exfoliative Toxine (ETA und ETB) verursacht wird und zu Blasenbildungen und Verlust der Epidermis führt. Die generalisierte Form tritt vorwiegend bei Säuglingen und Kleinkindern oder immunsupprimierten Erwachsenen auf. Das TSS ist

eine Multiorganerkrankung, die durch die Superantigen- und spezifische Toxinwirkung des Toxic-Shock-Syndrom-Toxins-1 (TSST-1) hervorgerufen wird (Bohach und Foster, 2000) und aufgrund einer massiven Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zu einer Schocksymptomatik führt (Fraser et al., 2000). Die Gastrointestinaletoxikose ist eine Lebensmittelintoxikation, die nach einer kurzen Inkubationszeit (2-6 Stunden) mit Übelkeit, Erbrechen und Abdominalschmerzen einhergeht. Das rasche Auftreten der Symptome wird durch die Aufnahme des bereits im Lebensmittel von *S. aureus* gebildeten Toxins hervorgerufen (Becker und Peters, 2009).

## **2.1.2 Antibiotikaresistenzen von Staphylokokken**

### **2.1.2.1 Resistenzmechanismen**

Als einer der größten Fortschritte in der Medizin gilt die Entdeckung des Antibiotikums Penicillin, das zur Gruppe der  $\beta$ -Laktamantibiotika gehört, durch Alexander Fleming im Jahre 1928. Zahlreiche lebensbedrohliche bakterielle Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier waren nun durch diese Waffe beherrschbar und verloren weitgehend ihren Schrecken. Jedoch treten Resistenzen gegen Antibiotika bei Bakterien während deren Anwendung zur Behandlung bakterieller Infektionen stets früher oder später auf (Kayser, 1998). Resistenzen entstehen dadurch, dass Bakterien entweder durch Mutationen bereits vorhandener Gene oder durch die Aufnahme von Genen in den Besitz von Resistenzgenen gelangen und diese anschließend auch weitergeben können (Piepersberg, 2001). Diese Resistenten-Varianten erlangen gegenüber den empfindlichen Keimen einen Selektionsvorteil und nehmen dadurch deren Platz ein. Der Gebrauch der Antibiotika in der Medizin und Veterinärmedizin führt nicht zur Evolution von Resistenz-Genen, sondern selektiert die auf natürliche Weise entstandenen resistenten Varianten heraus (Kayser, 1998).

Für die Behandlung von Staphylokokken-Infektionen haben  $\beta$ -Laktamantibiotika aufgrund ihrer allgemein guten Wirksamkeit, die im Angriff an die Zellwand der Staphylokokken begründet ist und damit bakterizid wirken, besondere Bedeutung. Zu den  $\beta$ -Laktamantibiotika zählen neben dem klassischen Penicillin im engeren Sinne die Antibiotika Methicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Carbenicillin, u.a. sowie im weiteren Sinne die Cephalosporine (Kroger, 2006).

Der Wirkungsmechanismus der  $\beta$ -Laktamantibiotika beruht zum einen auf einer Synthesehemmung des Peptidoglykans. Die beim letzten Syntheseschritt zum Peptidoglykan beteiligten Transpeptidasen werden durch Spaltung des  $\beta$ -Laktamrings acetyliert und damit inaktiviert. Dadurch wird die Entstehung des für die physikalische Stabilität der Bakterienzelle



verantwortliche Mureins gestört. Des Weiteren gehen  $\beta$ -Laktame kovalente Bindungen mit Penicillin-bindende Proteinen (PBP) ein, die neben enzymatischen Eigenschaften auch an Zellteilungsvorgängen beteiligt sind und somit zur Lysis und Abtötung der Bakterienzelle führen (bakterizide Wirkung) (Kroker, 2006).

In Methicillin-sensiblen Staphylokokken findet man vier membrangebundene Penicillin-bindende Proteine mit Carboxypeptidase-, Transpeptidase- oder Endopeptidase-Aktivität. Normalerweise binden sich alle  $\beta$ -Laktamantibiotika an das aktive Zentrum der PBP und unterbrechen dadurch die Zellwandbiosynthese.

Methicillin-resistente Stämme besitzen ein zusätzliches fünftes PBP, das PBP2a oder PBP2<sup>+</sup> genannt wird. Dieses zusätzliche PBP2a hat eine 1000-fach niedrigere Affinität zu allen  $\beta$ -Laktamantibiotika und übernimmt in Anwesenheit dieser Antibiotika die essentielle Transpeptidase-Reaktion. Dieser alternative Stoffwechselweg führt zur Bildung einer intakten Zellwand und dadurch zur Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika (Chambers, 1997; Hiramatsu et al., 2001; Pinho et al., 2001; Deurenberg und Stobberingh, 2009).

Das Penicillin-bindende Protein PBP2a wird von dem Methicillin-Resistenzgen (*mecA*-Gen) kodiert, das sich auf einem 20-40 kb großen chromosomalen DNA-Fragment (*mec*-Komplex) befindet (Chambers, 1997). Der *mec*-Komplex befindet sich wiederum auf einem mobilen genetischen Element, der chromosomalen Staphylokokken-Genkassette (Staphylococcus cassette chromosome *mec*, *SCCmec*) (Katayama et al., 2000). Derzeit werden acht Typen von *SCCmec* (Typ I bis VIII) mit verschiedenen Subtypen unterschieden (Zhang et al., 2009). Als Regulorgene für die Genexpression fungieren das *mecR1*- und *mecI*-Gen. Das *mecR1*-Gen kodiert ein *mecA*-Inducer-Protein, welches sich aus einer penicillinbindenden und einer transmembranösen Domäne zusammensetzt. Das *mecI*-Gen stellt einen Repressor für *mecA* dar. Diese Regulorgene ähneln in der molekularen Organisation, Struktur, Funktion und dem Mechanismus der Regulierung, den Regulorgenen für die  $\beta$ -Lactamase-Produktion *blaR1* und *blaI* (Niemeyer, 1996; Chambers, 1997).

Für die Mobilität der chromosomalen Staphylokokken-Genkassette (*SCCmec*) sind die Rekombinase-Gene (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*) verantwortlich (Katayama et al., 2000; Ito et al., 2001). Nach Angaben von Ito et al. (1999) inseriert jede Genkassette an der gleichen Stelle im Staphylokokken-Genom, das ist am 3'-Ende eines „open reading frame“ (ORF) mit bisher unbekannter Funktion.

### **2.1.2.2 Resistenzevolution**

Der Ursprung des *mecA*-Gens, das eine zentrale genetische Determinante der Methicillin-Resistenz von *S. aureus* (MRSA) und Staphylokokken spp. ausgenommen *S. aureus*

(MRSASA) darstellt, ist nicht eindeutig geklärt (Wu et al., 1996). Die genannten Autoren (Wu et al., 1996) entschlüsselten die Aminosäuresequenz eines PBP von *S. sciuri*, die sich zu 88% identisch mit dem PBP2a von Methicillin-resistenten *S. aureus*-Keimen erwies. Daraus schließen die Autoren, dass der Ursprung von PBP2a bei *S. sciuri* liegen könnte. Auch Hiramatsu et al. (2001) sehen den Ursprung des *mecA*-Gens in Koagulase-negativen Staphylokokken.

Die Entstehung von MRSA-Keimen stellt keinen Einzelfall dar, da die *SSCmec* Genkassetten von unterschiedlichen *S. aureus*-Populationen aufgenommen und weiterverbreitet wurden. Ein Indiz für mehrere Einträge von *SCCmec* in eine Genotypenlinie ist, dass sogar unterschiedliche Genkassetten-Typen in den gleichen Genotypenlinien vorkommen. So wurden ST5 und ST8 (ST = Sequenztyp) MRSA-Isolate mit jedem der damals vier bekannten *SCCmec*-Typen gefunden (Enright et al., 2002). Daraus lässt sich schließen, dass diese MRSA-Isolate vermutlich viermal entstanden sind. Zudem spricht die Präsenz von vier *SCCmec*-Typen in der gleichen Genotypenlinie dafür, dass der horizontale Transfer von *mec*-Genen relativ häufig stattfindet (Enright et al., 2002).

Die wichtigsten Methoden zur Untersuchung der Evolution von MRSA beruhen auf der molekularen Typisierung mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST), *SCCmec*- und *spa*-Typisierung. Mit diesen Methoden wurde die Entwicklung der MRSA-Klone, die seit den 1960er Jahren entstanden sind, untersucht und ihre weltweite Verbreitung studiert (Robinson und Enright, 2004; Leonard und Markey, 2008; Deurenberg und Stobberingh, 2009).

## **2.1.3 Nachweis von MRS**

### **2.1.3.1 Isolierung, Identifizierung**

Zur Abschätzung der Prävalenz von MRSA in Zuchtschweinebeständen hat die Europäische Union im Jahr 2008 eine Grundlagenstudie in allen Mitgliedsstaaten durchführen lassen. In der EU-Entscheidung 2008/55/EG zur Untersuchung von Zuchtschweinen auf MRSA werden die Probenentnahme sowie die Methoden der Isolierung und Identifizierung von MRSA-Keimen genau beschrieben (Anon, 2008a). Hierbei sind pro Betrieb mit trockenen sterilen Abstrichtupfern fünf Staubproben von jeweils einer Fläche von 500 cm<sup>2</sup> zu entnehmen. In jedem Betrieb sollen die rückwärtigen Oberflächen der Trennwände abgestrichen werden. Die Proben sollen so schnell wie möglich bei Temperaturen zwischen 2°C und 25°C an das untersuchende Labor befördert werden, so dass die Proben spätestens nach 10 Tagen im Labor ankommen. Die fünf Staubproben sind in 100ml Müller-Hinton-Bouillon supplimentiert mit 6,5% NaCl zu poolen und 16-24 Stunden aerob bei 37°C zu bebrüten (Voranreicherung).

Danach soll 1ml der Müller-Hinton-Bouillon in 9ml Trypton-Soja-Bouillon supplimentiert mit 3,5 mg/l Cefoxitin und 75mg Aztreonam überführt und 16-20h bei 37°C bebrütet werden (Anreicherung). Von der bebrüteten Trypton-Soja-Bouillon soll anschließend eine Öse voll auf einen chromogenen MRSA-Selektivagar ausgestrichen und 24-48 Stunden bei 37°C bebrütet werden. Danach sollen bis zu fünf MRSA-verdächtige Kolonien, die auf der Grundlage der Morphologie und der Farbe der Kolonien identifiziert werden, auf Blutagar subkultiviert werden. Eine anschließende Multiplex-PCR ermöglicht zum einen die Identifizierung auf Speziesebene und zum anderen das Detektieren des *mecA*-Resistenzgenes. Zur Begrenzung des Arbeitsaufwandes sollte zunächst nur eins der fünf ausgesuchten Isolate identifiziert werden. Wird dieses Isolat als MRSA identifiziert, können die restlichen vier Isolate verworfen werden, ansonsten sollen weitere Isolate untersucht werden. Auf diese Weise soll sichergestellt werden, dass unter den fünf selektierten *S. aureus*-Isolaten kein MRSA-Isolat übersehen wird. Abschließend sollen alle MRSA-Isolate einer *spa*-Typisierung unterzogen werden und mit etwa 2% der Sammelproben eine MLST-Typisierung durchgeführt werden. Ein Test auf Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika ist fakultativ.

In der Fachliteratur wurden bisher verschiedene Verfahren zur Isolierung von MRSA-Keimen aus Proben von Tieren veröffentlicht, aber noch kein systematischer Vergleich der Methoden durchgeführt (Graveland et al., 2009). Aus diesem Grund haben die genannten Autoren drei häufige Verfahren und drei chromogene Nährböden zum Nachweis von MRSA in Nasenabstrichen von Schweinen (n = 70) und Kälbern (n = 100) getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Verfahren mit einer Voranreicherung bestehend aus einer Müller-Hinton-Bouillon mit Zusatz von 6,5% NaCl, einer anschließenden Anreicherung in einer mit einem Antibiotikum supplementierten Bouillon und abschließender Kultivierung auf einem MRSA-Selektivnährboden zu den besten Ergebnissen führt. Als Antibiotikum empfiehlt sich Cefoxitin und nicht Penicilline, da Cefoxitin eine vielfach stärkere Induktion des *mecA*-Regulatorsystems auslöst (McKinney et al., 2001). Graveland et al. (2009) kommen zu dem Schluss, dass die Wahl eines Selektivagars von der Probenmatrix abhängig gemacht werden sollte. Auch Brown et al. (2005) kommen zu der Schlussfolgerung, dass es kein Medium gibt, das bei allen MRSA-Stämmen gleich gute Ergebnisse erzielt, da die MRSA-Stämme heterogen sind und unterschiedliches Verhalten unter bestimmten Bedingungen zeigen.

Für eine rasche Identifizierung von Bakterien stellt die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) bei Anwendung standardisierter Aufzuchtbedingungen ein sehr gut reproduzierbares Verfahren dar (Helm et al., 1991; Horlacher und Rau, 2006; Rau et al., 2009). Das FT-IR-Verfahrens basiert darauf, dass unterschiedliche chemische Verbindungen nach Bestrahlung mit Infrarot (IR) unterschiedliche Spektren (IR-Spektren) ergeben

(Neumann et al., 1990). Dies bedeutet, dass bestimmte funktionelle Gruppen organischer Substanzen charakteristische IR-Spektren aufweisen.

Bakterien bestehen aus unterschiedlichen organischen Substanzen, die in ihrer Zusammensetzung für bestimmte Bakterien-Arten, -Unterarten oder sogar -Isolate einheitlich sind, sich aber aufgrund ihrer IR-Spektren von anderen Bakterien abgrenzen lassen. Durch gemeinsame und unterschiedliche IR-Spektren ist somit eine Differenzierung und Identifizierung von Bakterien möglich. Die aufgezeichneten IR-Spektren bekannter Bakterien werden in Datenbanken hinterlegt, so dass ein Vergleich von IR-Spektren unbekannter Keime eine Zuordnung zu Keimen der Datenbank mit hoher Sicherheit erlauben (Helm et al. 1991, Rau et al. 2009). Die IR-Spektren machen sehr differenzierte Typisierungen von Bakterien möglich, ohne auf bestimmte Erregergruppen beschränkt zu bleiben. Darüber hinaus erwies sich die FT-IR-Spektroskopie als schnelles und einfach durchführbares Verfahren zur Identifizierung von Bakterien aus Kulturen (Naumann et al., 1990; Kirschner, 2004; Horlacher und Rau, 2006).

Nach Angaben von Horlacher und Rau (2006) ergab das FT-IR-Verfahren bei 810 verschiedenen Bakterien-Stämmen eine Zuordnung auf Speziesebene mit einer Sicherheit von von 89,5%. Bei 0,5% der Stämme wurde die Spezies nicht richtig erkannt und 10% der Isolate konnten nicht eindeutig bestimmt werden. Von insgesamt 110 *Staphylococcus aureus*-Isolaten konnten mit dem FT-IR-Verfahren 98,2% richtig auf Speziesebene zugeordnet werden, nur zwei der Isolate konnten nicht eindeutig bestimmt werden (Horlacher und Rau, 2006).

### **2.1.3.2 Nachweis des *mecA*-Resistenzgens**

Die PCR ist ein Verfahren zur spezifischen Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Auch für die Detektion des *mecA*-Resistenzgens von MRSA ist die PCR das Verfahren der Wahl (Grisold et al., 2002; Loo et al., 2003; Hope et al., 2004; Wellinghausen et al., 2009). Während mit Hilfe klassischer PCR-Verfahren am Ende eines Laufs die Amplifikate mittels Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden, ist dies bei der sog. Real-Time PCR schon während des Laufs möglich. Dadurch kann der Zeit-, Material- und Arbeitsaufwand entscheidend reduziert werden (Wittwer et al., 1997). Dies betrifft insbesondere die Real-Time PCR, bei der mit Hilfe interkalierender Farbstoffe wie z.B. SYBR Green die Amplifikate im Laufe ihrer Synthese durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden können. Dieses Verfahren hat sich für den Nachweis von Virulenzgenen bei Bakterien in Reinkulturen bewährt (Sting und Stermann, 2008).

### 2.1.3.3 Molekulare Typisierung

Die wichtigsten Methoden zur Untersuchung der Evolution von MRS-Keimen beruhen zum einen auf molekularbiologischen Typisierungsverfahren wie der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), der Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST) und der *spa*-Typisierung, die eine Einteilung in verschiedene Typen von *S. aureus* ermöglichen und zum anderen auf der Grundlage der *SCCmec*-Typisierung, die eine Einteilung in die verschiedenen Typen der chromosomalen Staphylokokken Genkassette (Staphylococcus cassette chromosome *mec*, *SCCmec*) bei MRSA und MRSASA, ermöglicht (Shopsin et al., 1999; Enright et al., 2000; Robinson und Enright, 2004; Leonard und Markey, 2008; Deurenberg und Stobberingh, 2009).

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist die am häufigsten eingesetzte Methode zur Typisierung von MRSA-Isolaten (Murchan et al., 2003) und bildet den Goldstandard für deren Typisierung (Trindade et al., 2003; Bens et al., 2006). Bei der PFGE wird ein DNA-Fingerabdruck des bakteriellen Genoms durch Restriktionsverdau mit Hilfe des Enzyms *SmaI* erstellt, so dass aufgrund der sehr guten Reproduzierbarkeit und Trennschärfe der entstehenden DNA-Fragmente diese Methode zur Differenzierung von verwandten Stämmen herangezogen werden kann. Die Endonuklease *SmaI* schneidet das Genom an bekannten Schnittstellen in Fragmente, die sich anschließend durch Anwendung periodischer, in der Richtung wechselnder elektrischer Felder, elektrophoretisch im Agarose-Gel auftrennen lassen. Nachteile dieser Methode sind der hohe Personal-, Zeit- und der damit verbundene hohe Kostenaufwand (Leonard und Markey, 2008; Fetsch et al., 2009a).

Einige Linien der MRSA-Typen, die von besonderem Interesse sind, wie z.B. ST398, sind allerdings nicht mit Hilfe der PFGE und der Restriktionsendonuklease *SmaI* typisierbar. Diese werden deshalb als NT-MRSA (non-typeable MRSA) bezeichnet. NT-MRSA besitzen ein Restriktionsmodifikationsenzym, das die Zielsequenz des *Sma*-Enzyms *SmaI* methyliert und somit inaktiviert (Bens et al., 2006). Eine neue Möglichkeit der Typisierung mittels PFGE besteht in der Nutzung des Neoschizomers *Cfr9I* (Bosch et al., 2010; Cuny, 2010).

Eine weitere Methode der Feintypisierung stellt die Multi Locus Sequenztypisierung (MLST) dar. Die MLST beruht auf allelen Polymorphismen innerhalb von sogenannten „housekeeping genes“ (*yqiL*, *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta* und *tpi*). Dabei wird durch eine Sequenzanalyse von diesen sieben „housekeeping genes“ die Verwandtschaft der MRSA Isolate ermittelt. Über eine Online-Datenbank ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)) wird eine Zuordnung der ermittelten Gensequenzen an jedem einzelnen Locus zu einzelnen Alleltypen möglich. Den Allelen werden dabei verschiedene arabische Ziffern zugeteilt. Jeder Stamm ist durch die Allele an den sieben Loci definiert. Der Sequenztyp setzt sich somit aus den sieben

Alleltypen zusammen, der eine genetische Einordnung mit verwandten Linien erlaubt. Als Maß für den Verwandtschaftsgrad gelten die allelischen Übereinstimmungen. So zeigen Isolate, die einem Klon angehören, denselben Sequenztyp (Enright et al., 2000; Enright et al., 2002; Fetsch et al., 2009a). Die MLST Methode ist allerdings aufgrund der begrenzten Trennschärfe weniger für kurzfristige epidemiologische Analysen nützlich und wegen der notwendigen DNA-Sequenzierungen von sieben verschiedenen genomischen Loci sehr teuer (Cuny et al., 2010).

Die sog. *spa*-Typisierung ist eine PCR Methode zur Typisierung von *S. aureus*. Frenay et al. (1996) entwickelten eine Typisierungsmethode auf der Basis der polymorphen Region X in dem Gen, welches das Protein A von *S. aureus* (*spa*) kodiert. Das Protein A bildet einen Bestandteil der Zellwand von *S. aureus*. Die X-Region besteht aus einer variablen Anzahl sich wiederholender Genabschnitte (Repeats), so dass aus der Nukleotidsequenz und der Abfolge dieser Repeats ein bestimmter *spa*-Typ resultiert. Bei der *spa*-Typisierung handelt es sich um eine Single Locus Sequenztypisierung (SLST), die im Vergleich zu Multi Locus Sequenztypisierung wesentlich kostengünstiger ausfällt (Shopsin et al., 1999; Fetsch et al., 2009a). Die *spa*-Typen sind in der Regel mit spezifischen MLST-Typen assoziiert (Strommenger et al., 2006). Die *spa*-Typisierung ist in ihrem Differenzierungsgrad mit der Pulsfeldgelelektrophorese als gleichwertig anzusehen. Die niedrigeren Kosten, die weniger komplizierten technischen Laborarbeiten und die Möglichkeit der Typisierung von NT-MRSA (non-typeable MRSA) machen die *spa*-Typisierung als Charakterisierungsmethode für MRSA-Stämme zu einer einfachen und rasch durchführbaren Typisierungsmethode für die Aufklärung stammesgeschichtlicher Beziehung von MRSA-Isolaten (Bens et al., 2006; Strommenger et al., 2006; Wewers, 2008).

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung von MRS-Isolaten stellt die sog. *SCCmec*-Typisierung dar. Der *mec*-Komplex, der das *mecA*-Gen enthält und auf der chromosomalen Staphylokokken Genkassette (Staphylococcus cassette chromosome *mec*, *SCCmec*) sitzt, unterliegt einer gewissen Variabilität (Katayama et al., 2000). Diese Variabilität macht man sich bei der *SCCmec*-Typisierung zunutze. Derzeit werden acht *SCCmec*-Typen (Typ I bis VIII) mit verschiedenen Subtypen mittels Real-Time PCR unterschieden. Die Einteilung erfolgt aufgrund der Rekombinase-Gene des vorliegenden *mec*-Komplexes (Zhang et al., 2009). Die Staphylokokken-Genkassette *SCC* ist ein genetisches Austauschsystem für Staphylokokken, die nicht immer mit einem *mec*-Komplex verbunden sein muss und als mobiles Element auch bei MRKNS weit verbreitet ist (Ito et al., 2001). Jansen et al. (2009) geben zu bedenken, dass einige etablierte *SCCmec*-Typisierungsmethoden jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Typisierung führen können.

## 2.1.4 Vorkommen und Bedeutung von MRS

### 2.1.4.1 MRS bei Menschen

MRSA-Infektionen stellen heute weltweit eine der größten Herausforderungen für die Infektionsmedizin dar (Pulz, 2009).

Die ersten Entdeckungen Methicilli-resistenter *S. aureus*-Stämme waren 1961 in Großbritannien und 1968 in einem Krankenhaus in Boston, USA (Barber, 1961; Barret et al., 1968).

Angaben über Prävalenzen der Besiedlung mit MRSA in der Bevölkerung sind weltweit nur punktuell vorhanden. In einer international durchgeführten Metaanalyse wurden von Salgado et al. (2003) eine Prävalenz für MRSA in der Bevölkerung von 1,3% ermittelt. In einer Studie von Fluegge et al. (2006) waren ein Viertel von gesunden Kindern einer Schule in Süd-West Deutschland mit *S. aureus* besiedelt, von denen aber nur 0,3% MRSA-Keime darstellten. In den USA sind bei 2% der gesunden Bevölkerung die Schleimhäute des Nasen-Rachenraumes mit MRSA besiedelt (Kenner, 2003).

In einer Studie von 1999 bis 2002 von Tiemersma et al. (2004) variiert der Anteil an MRSA an *S. aureus*-Keime, die bei Patienten in Krankenhäusern isoliert werden konnten, von 1% in Nordeuropa bis 40% in Süd- und Westeuropa.

Die mittlere Halbwertszeit für MRSA im Nasen-Rachenraum wurde mit 40 Monaten angegeben (Sanford et al., 1994). Keimträger können dadurch ohne eine Sanierung für lange Zeit als potentielle Streuherde gelten (Hudson, 1994). Eine Besiedlung mit MRSA führt wiederum zu einer fünf- bis 21-fachen Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Infektion, die mit klinischen Symptomen verbunden ist (Kluytmans et al., 1997). Klotz et al. (2005) stellten fest, dass eine überraschend hohe Zahl an MRSA-Isolaten aus Stuhlproben isoliert wurde. Die Besiedlung des Magen-Darm-Trakts und damit eine fäkale Kontamination, spielt offenbar eine wichtige Rolle bei der Verbreitung von MRSA.

Als Risikofaktoren für eine Infektion mit MRSA werden Aufenthalte in Krankenhäusern und Pflegeheimen, einschließlich der beruflichen Tätigkeiten in diesen Einrichtungen, chronische Erkrankungen, Hautwunden und der Einsatz von Antibiotika genannt (Schneider-Lindner et al., 2007).

Derzeit werden drei Quellen für Infektionen und Besiedlungen mit MRSA bei Menschen unterschieden. MRSA-Stämme, die ihren Ursprung in Krankenhäusern und Kliniken haben, sogenannte hospital acquired MRSA (haMRSA). MRSA-Stämme die in einer stationären Einrichtungen erworben werden und durch Patienten wieder in Krankenhäuser zurückgebracht und dort 48 Stunden nach Hospitalisierung identifiziert werden, sogenannte health care associated MRSA (hcaMRSA) und MRSA-Stämme, deren Ursprung nicht mit

solchen Einrichtungen verbunden sind, sogenannte community acquired MRSA (caMRSA) (Bartels et al., 2007; Fetsch et al., 2009a; McCarthy et al., 2010). Im Bereich der Tiergesundheit und Lebensmittelsicherheit gibt es die livestock-associated MRSA (laMRSA), die überwiegend MRSA des MLST-Typ ST398 sind und weitgehend ohne klinische Erscheinung in Nutztierbeständen auftreten. Als Risikogruppe für die Besiedlung und Infektion mit laMRSA werden Personengruppen angesehen, die sich beruflich mit Nutztieren beschäftigen (Landwirte, Tierärzte, Schlachthofpersonal) (Fetsch et al., 2009a).

So hat MRSA ST398 eine weite Verbreitung als nasaler Besiedler beim Schwein sowie exponierten Menschen und wurde mittlerweile auch bei anderen Tierspezies nachgewiesen. Dies wird als Ausdruck gering ausgeprägter Wirtsspezifität gesehen (De Neeling et al., 2007; Meemken et al. 2008; Cuny et al., 2009). Infektionen mit dem Typ ST398 beim Menschen sind insgesamt gesehen noch selten.

Die Pathopotenzen von MRSA ST398 beim Menschen wird aus dem Nachweis bei tiefgehenden Haut- und Weichgewebeeinfektionen, bei Beatmungspneumonien, bei einer Sepsis sowie zwei letalen Ausgängen deutlich (Cuny et al., 2009).

#### MRSA in Krankenhäusern (haMRSA)

Das Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) erfasst Daten von nosokomialen Infektionen aus deutschen Krankenhäusern. So wurden im Jahr 2009 in 199 Krankenhäusern 28.195 MRSA Fälle erfasst, von denen 79,52% mitgebrachte und nur 20,48% nosokomial erworbene Fälle darstellten ([www.nrz-hygiene.de](http://www.nrz-hygiene.de); Mai 2010). Kitzrow (2000) berichtet von einem durchschnittlichen Anteil von 25% MRSA-Keimen von 3053 untersuchten *S. aureus* Isolaten aus Universitätskliniken in Europa und einem deutlichen Nord-Süd-Gefälle innerhalb Europas.

Zwischen den einzelnen Abteilungen in Krankenhäusern gibt es hinsichtlich der MRSA Prävalenz große Unterschiede. So lag der MRSA-Anteil in Abteilungen der Inneren Medizin bei 33%, in Abteilungen der Intensivstation bei 27% und der chirurgischen Stationen bei 13%. Die niedrigsten MRSA-Prävalenzen wurden bei *S. aureus*-Isolaten aus der Notaufnahmen (0%) und den Krankenhausambulanzen (1%) gefunden (Kitzrow, 2000).

Die Mehrzahl der bisher weltweit beschriebenen haMRSA können 11 großen Klonen, die vier klonalen Komplexen angehören, zugeordnet werden. Für einige dieser sogenannten Epidemiestämme ist eine kontinentale und sogar globale Verbreitung sehr wahrscheinlich (Witte et al., 2008). In Deutschland gehören die meisten klonalen Linien dem Sequenztyp ST22 (t005, t002, t032) („Barnim“-Epidemiestamm) an, an zweiter Stelle steht der „Rhein-Hessen“-Epidemiestamm mit den Sequenztypen ST5 (t002) und ST225 (t003) (Epidemiologisches Bulletin, 2009).



### MRSA in Alten- und Pflegeeinrichtungen (hcaMRSA)

Alten- und Pflegeeinrichtungen können Reservoirs für MRSA sein. In einer überregionalen Studie in solchen Einrichtungen in den Jahren 1999 bis 2001 ergab sich für Deutschland eine MRSA-Prävalenz von 2,4% bezogen auf die Bewohnerzahl. 60% dieser MRSA-positiven Bewohner hatten im letzten halben Jahr einen Klinikaufenthalt. So wurden in dieser Studie immer wieder die gleichen MRSA-Epidemiestämme in Alten- und Pflegeheimen gefunden, die den Isolaten nosokomialer MRSA-Infektionen in Krankenhäusern der jeweiligen Region entsprachen (Epidemiologische Bulletin, 2003; Heuck et al., 2000; Neuhaus et al., 2003).

### MRSA in der Bevölkerung (caMRSA)

caMRSA-Stämme treten bei der Bevölkerung außerhalb der Krankenhäuser vor allem bei jungen gesunden Personen und auch Kindern auf. Die Mehrheit der caMRSA-Infektionen sind milde Haut- und Weichteilinfektionen, es wird aber auch von schweren, lebensbedrohlichen Fällen mit Pneumonie und Sepsis berichtet (Herold et al., 1998; Maltezou und Giamarellou, 2006; Witte et al., 2008). Infektionen mit caMRSA treten in Europa viel seltener auf als in den USA. In den USA gehören diese Stämme zu einem einzigen Klon (USA 300 ST8), während sie in Europa aus einer Vielzahl von Klonen entstanden sind. Meistens treten andere klonale Linien als bei haMRSA-Infektionen auf, es gibt jedoch klonale Linien, die sowohl bei haMRSA wie auch bei caMRSA auftreten (Pantosti und Venditti, 2009; Witte, 2009).

### **2.1.4.2 MRS bei Tieren**

Das Auftreten von MRSA-Keimen bei Tieren wurde erstmals von Devriese et al. (1972) für Milchproben an Mastitis erkrankter Kühe aus belgischen Milchviehherden beschrieben. In den letzten Jahren wird nun verstärkt über das Auftreten von MRSA als Besiedler und Infektionserreger von Tieren berichtet (Cuny et al., 2009; Leonard und Markey, 2008; Spohr et al., 2010).

Nach Fetsch et al. (2009a) unterscheidet man heute im Bereich der Tiergesundheit zwei Problemkreise. Der eine Problemkreis entsteht durch vorwiegend von Menschen stammende MRSA-Keime bei Haus- und Heimtieren. Dabei steht eine nosokomiale Problematik in Tierarztpraxen und -kliniken im Mittelpunkt. Der zweite Problemkreis umfasst MRSA, die bei Nutztieren auftreten und deshalb auch als livestock-associated MRSA (laMRSA) bezeichnet werden. Diese laMRSA gehören meistens zum MLST-Typ ST398, treten weitgehend ohne klinische Erscheinungen auf und scheinen eine erhebliche Ausbreitungstendenz zu haben.

### 2.1.4.2.1 MRS bei Nutztieren

Berichte zu Untersuchungen zu MRSA bei landwirtschaftlichen Nutztieren liegen vor allem für Schweine, aber auch für Rinder, Pferde und nur in geringem Umfang für Geflügel vor.

#### Schweine

Für Schweine wurden bisher zahlreiche Untersuchungsergebnisse publiziert, in denen diese Tierart in verschiedenen Produktionszusammenhängen und unterschiedlichen Ländern auf MRSA untersucht worden ist (Tenhagen et al., 2009). So wurde darüber hinaus durch die Europäische Union in Schweinezuchtbeständen aller Mitgliedsstaaten eine Grundlagenstudie im Jahr 2008 zur Abschätzung der Prävalenz von MRSA veranlasst (EU-Zuchtschweine-Studie Entsch. 2008/55/EG; Anon, 2008a). Diese Studie erfasste in jedem Mitgliedsstaat mindestens 80% der Zuchtschweinebetriebe. Pro Betrieb wurden fünf einzelne Staubproben aus verschiedenen Stallabteilen entnommen, diese wurden zur einer Probe je Betrieb gepoolt und auf MRSA untersucht. Das Ergebnis für Deutschland wurde vom BfR in der Stellungnahme Nr. 044/2009 veröffentlicht (BfR, 2009). Darin wird festgestellt, dass von 201 beprobten Beständen 84 (41,8%) in den untersuchten Staubpoolproben MRSA-Keime aufwiesen. Die isolierten MRSA konnten zu 93% dem bei Nutztieren häufig auftretenden Sequenztyp (MLST-Typ) ST398 zugeordnet werden. Sechs der insgesamt 84 Isolate gehörten nicht dem MLST-Typ ST398 an (7,1%). Die drei am häufigsten vorkommenden *spa*-Typen waren t011 (66,7%), t034 (14,3%) und t108 (6,0%) (MLST-Typ ST389). Weitere einzelne Isolate konnten den *spa*-Typen t007 (MLST-Typ ST398), t1430 (MLST-Typ ST9), t3992 sowie t5487 (MLST-Typ ST9) zugeordnet werden.

Frick (2010) konnte in Bayrischen Schweinebeständen (Ferkelproduzenten, geschlossene Systeme und Mast) eine Bestandsprävalenz von 45% ermitteln. Dabei erwiesen sich von 634 Schweinen aus 60 Beständen 211 Schweine aus 27 Beständen als MRSA-positiv. Die Schweine wurden mittels Nasenschleimhautabstrichen beprobt.

Bei einer Studie zum Vorkommen von MRSA, die bei 678 Schweinen aus 347 Beständen in Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen durchgeführt wurde, konnte auf Einzeltierebene eine Nachweishäufigkeit von 13% (85 positive Tiere) und auf Bestandsebene eine Nachweishäufigkeit von 18% (62 positive Bestände) ermittelt werden. Alle isolierten Stämme wurden dem MLST-Typ ST398 zugeordnet (Meemken et al., 2008). Eine andere Studie auf der Grundlage von 1.600 Einzeltierproben aus 40 Schweinebetrieben ergab für Deutschland das Vorkommen von MRSA-Keimen in 70% der untersuchten Betriebe. Dazu wurden 40 Nasentupferproben pro Betrieb in Achter-Pools zusammengefasst und auf MRSA untersucht (n=320). Von diesen 320 Poolproben erwiesen sich 169 (52,8%) als MRSA-positiv, die sich auf 28 Betriebe verteilten. Die *spa*-Typisierung der Isolate ergab die *spa*-Typen t011, t034,

t108, t1451 und t2510, die dem MLST-Typ ST398 zugeordnet wurden (Köck et al., 2009). Untersuchungen von insgesamt 540 Nasentupfern an neun niederländischen Schlachthöfen ergaben, dass sich 209 Tiere (39%) als MRSA-Träger des MLST-Typ ST398 erwiesen, wobei bei allen Schlachthöfen MRSA-positive Tiere auftraten. Die dazugehörigen *spa*-Typen waren hauptsächlich t011, t108 und t1254, bei den *SCCmec*-Typen handelte es sich um *SCCmec* III, IVa und V (De Neeling et al., 2007). Weitere Studien aus Dänemark, Portugal, den Niederlanden und Kanada belegen, dass Schweine MRSA-Träger ohne klinische Symptome sein können (Huijsdens et al., 2006; Lewis et al., 2008; Khanna et al., 2008; Pomba et al., 2009).

Van Duijkeren et al. (2007) berichten über MRSA Keime, die aus einer exsudativen Dermatitis bei Ferkeln angezüchtet wurden. Auch Blaha et al. (2008) berichten von MRSA Isolaten, die von pathologisch-anatomischen Veränderungen der Haut, der Gelenke, der serösen Häute, des ZNS und des Pericards stammen.

Sowohl *S. aureus* als auch koagulase-negative Staphylokokken von Schweinen, Hunden und Katzen mit akuten Infektionen aus Deutschland wurden auf das Vorhandensein von *mecA*-Genen in einer Studie von Schwarz et al. (2008) untersucht. Von den 248 untersuchten Stämmen waren fünf MRSA Stämme von Schweinen und zwei *S. pseudintermedius* von Hunden *mecA*-Gen positiv.

Der Einkauf MRSA kolonisierter Schweine ist ein nachgewiesener Weg der Verbreitung von MRSA-Keimen. In einer dänischen Studie waren 23% der Schweinebetriebe MRSA-positiv. Dabei erwiesen sich fünf von sechs Betrieben, die Schweine von MRSA-positiven Betrieben erhalten hatten, als MRSA-positiv. Zudem waren die *spa*-Typen der MRSA Isolate bei den Betrieben, die die Schweine lieferten, dieselben wie in den Betrieben, die die Schweine einstellten. Allerdings war auch ein Betrieb MRSA-positiv, der keine Schweine zukaufte. Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Studie ist, dass Betriebe, bei denen die Schweine routinemäßig mit Antibiotika behandelt wurden, ein höheres MRSA-Risiko hatten als Betriebe, in denen die Antibiotikabehandlungen der Schweine restriktiver gehandhabt wurden (Van Duijkeren et al., 2008).

### Milchrinder

Nach dem ersten Auffinden von MRSA Keimen in Mastitismilchproben 1972 gab es immer wieder vereinzelte Berichte über das Auftreten von MRSA bei Milchkühen (Devriese et al., 1972; Devriese und Hommez, 1975; Joo et al., 2001; Lee, 2006). So isolierten kürzlich Spohr et al. (2010) MRSA-Keime in Milchviehbetrieben in Baden-Württemberg sowohl aus Viertelanfangsgemelkproben von Kühen mit Mastitiden als auch von Maul- und Nasenabstrichen von Kälbern, Strichkanal-, Scheiden- und Nasenabstrichen von eutergesunden Kühen, Gemelksproben von eutergesunden Kühen, Nasenabstrichen von

Melkern und aus Stallstaub angeschlossener Schweineställe. Alle in der Studie von Spohr et al. (2010) isolierten MRSA Isolate trugen die *SCCmec* Kasette vom Typ V, den MLST-Typ ST398 und den *spa*-Typ t011.

Virgin et al. (2009) berichtet über das Vorkommen von MRSA und Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokken in Tankmilchproben von Milchkuhbeständen in den USA.

### Pferde

In einer umfangreichen Studie wurden im Zeitraum von 2004 bis 2008 hospitalisierte Pferde und betreuendes Personal der Veterinärmedizinischen Universität Wien auf MRSA untersucht. Unter den Pferden waren bei 26% MRSA-Keime in relevanten Infektlokalisationen sowie bei Nasenabstrichen nachweisbar, ebenso waren bei 12,5% der Mitarbeiter auf der Nasenschleimhaut MRSA-Keime nachweisbar. Bei der anschließenden Typisierung konnten die *spa*-Typen t036 (MLST-Typ ST254), t011 (MLST-Typ ST398) und t0127 (MLST-Typ ST1) identifiziert werden. Während die MRSA-Keime vom *spa*-Typ t036 und *spa*-Typ t011 sowohl bei Pferden aus Wundabstrichen als auch bei Menschen aus Nasenabstrichen isoliert werden konnten, gelang die Isolierung von MRSA vom *spa*-Typ t0127 nur bei Pferden (Cuny et al., 2006; Cuny, 2008; Cuny et al., 2009).

Auch Walther et al. (2009) konnten MRSA Stämme mit den MLST-Typen ST254, ST22, ST117, ST398 und ST8 bei Pferden isolieren. Weese et al. (2005) isolierten denselben MRSA Stamm bei Pferden und Kontaktpersonen in den USA.

### Geflügel

Berichte über das Vorkommen vereinzelter Fälle von MRSA-Keimen liegen vor. So berichten Kwon et al. (2006) und Lee (2003) von drei MRSA-positiven *SCCmec* III Isolaten von Geflügelfleisch in Korea. Nemati et al. (2008) beschreiben, dass sie erstmals ST398 bei gesundem Geflügel nachweisen konnten. Dazu wurden 90 *S. aureus*-Isolate, die im Jahr 1970 aus Sehnenscheiden von kranken Hühnern, aus der Nase und der Kloake von gesunden Mastelertieren und 81 Isolate, die im Jahr 2006 aus der Nase und Kloake von gesunden Putenbroilern gewonnen worden waren, auf deren Resistenzeigenschaft gegenüber Antibiotika untersucht. Von diesen erwiesen sich zehn *S. aureus*-Isolate als MRSA. Bei der anschließenden Typisierung erwiesen sich die MRSA Isolate als *spa*-Typ t011 des *SCCmec*-Typs IVa und V und zwei Isolate als *spa*-Typ t567 des *SCCmec* Typs III. Alle Isolate ordneten die Autoren deswegen dem MLST-Typ ST398 zu.

Persoos et al. (2009) untersuchte 50 Legehennen aus zehn Betrieben (fünf pro Betrieb) und 75 Broiler aus 14 Betrieben (fünf pro Betrieb) auf MRSA in Belgien. Ein Betrieb wurde zweimal im Abstand von vier Monaten untersucht. Pro Tier wurden Tupfer von der Kloake

und den Nasenlöchern entnommen. Keine der Proben von den Legehennen war MRSA-positiv. Die Autoren führen dies möglicherweise auf den geringen Antibiotika-Einsatz bei Legehennen zurück. Dagegen wurden MRSA-Isolate bei den Broilern nachgewiesen, die mit verschiedenen Antibiotika behandelt wurden. Von diesen erwiesen sich acht der Broiler aus zwei verschiedenen Betrieben als MRSA-positiv. In einem positiven Betrieb waren alle fünf untersuchten Tiere positiv, in dem anderen positiven Betrieb war ein Tier positiv. MRSA wurde in gleicher Anzahl in den Proben der Nasenlöcher und denen der Kloake gefunden. Die Anzahl dieser Proben reicht allerdings nicht aus, um Prävalenzdaten angeben zu können. Alle isolierten MRSA-Isolate gehörten dem *spa*-Typ t1456 an, mit der dazugehörigen MLST-Typisierung ST398. Nach Persoons et al. (2009) wurde dieser *spa*-Typ bisher noch nicht bei anderen Tieren nachgewiesen und wird deshalb von den Autoren als ein typischer Geflügel-*spa*-Typ angesehen.

Kawano et al. (1996) wiesen MRKNS in ein bis acht Wochen alten gesunden Junghennen in Japan nach. Dazu untersuchten sie Haut- und Nasentupfer von 280 Tieren aus drei Ställen eines Betriebes. Bei 72 (25,7%) der Hühner wurden MRKNS auf der Haut und oder der Nase festgestellt. Im ersten Stall waren 8,6% der untersuchten Hühner im Alter von vier Wochen MRKNS positiv. Im zweiten Stall waren alle der untersuchten Hühner im Alter von drei bis vier Wochen positiv und im dritten Stall waren 2,2% der untersuchten Hühner im Alter von ein bis acht Wochen MRKNS-positiv. Die Identifizierung einiger Isolate mittels Api-Staph erbrachte bei 36 Isolaten die Identifizierung als *S. sciuri*, bei drei Isolaten als *S. saprophyticus* und bei fünf Isolaten als *S. epidermidis*. Nur fünf der Isolate wurden mittels PCR auf das *mecA*-Gen untersucht, wobei alle fünf das *mecA*-Gen trugen. Zudem isolierten diese Autoren *S. aureus* bei 103 (79,2%) von 130 untersuchten Hühnern. Kein *S. aureus*-Isolat wuchs bei 12.5 µg Methicillin oder 6.25 µg Oxacillin pro Liter Agar-Medium. Alle *S. aureus*-Isolate wurden somit als Methicillin-sensible *S. aureus* charakterisiert.

Cortez de Jäckel et al. (2006) wiesen Methicillin-resistente Koagulase-negative Staphylokokken (MRKNS) in Puten nach. Dazu wurden 130 Staphylokokken-Isolate untersucht, 128 der Isolate stammten von klinischen Proben von Puten und zwei Isolate stammen von Impfausrüstungen unterschiedlicher Betriebe in Westfalen und Niedersachsen. Einbezogen wurden in diese Studie zudem die von Legehennen, Broilern, Puten, Enten und Gänse isolierten Staphylokokken-Arten. Insgesamt 34 der 74 Isolate, die von Puten mit klinischen Symptomen oder den Impfausrüstungen stammten, erwiesen sich als KNS. Von diesen 34 KNS Isolaten waren vier (11,8%) *mecA*-Gen positiv. Zwei der MRKNS Isolate wurden als *S. sciuri* identifiziert, ein Isolat als *S. xylosus* und ein Isolat als *S. lentus*. Keines der 74 *S. aureus*-Isolate von Puten und anderem Geflügel war gegen Oxacillin resistent und erwies sich somit nicht als MRSA. Die Autoren schließen daraus allerdings nicht, dass MRSA-Keime in Zukunft keine Rolle bei Puten in Deutschland spielen werden.

In einer umfangreichen Studie konnte Dullweber (2010) MRSA in deutschen Masthähnchenbetrieben nachweisen. Dabei erwiesen sich 70 von 270 Tracheal- und Staubproben (26%) aus 30 Masthähnchenbetrieben als MRSA-positiv. Zudem konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass Staubproben aus der Umgebung der Masthähnchen sich genauso für eine Abschätzung der Herdenprävalenz eignen wie auch Staubproben aus Schweineställen. 32 der Isolate wurden ausgewählt und typisiert, dabei konnten die zwei mit dem ST398-Komplex assoziierten *spa*-Typen t011 und t034 mit der SCC*mec* V-Kassette nachgewiesen werden. Zudem konnte der *spa*-Typ t1430 mit der SCC*mec* II-Kassette nachgewiesen werden.

Hasman et al. (2010) untersuchten neben Rinder- und Schweine-Isolaten auch Geflügel-Isolate in Dänemark auf MRSA. Von den 85 Geflügel-Isolaten gehörten 96% zum MLST-Typ ST005 mit dem häufigsten *spa*-Typ t002. Dieser *spa*-Typ ist der siebthäufigste bei Menschen in Dänemark auftretende *spa*-Typ. Andere auftretende *spa*-Typen waren t006, t306, t688, t2049, t2308, t213 und t304. Im Vergleich zur Bandbreite der *spa*-Typen bei den Rinder- und Schweine-Isolaten traten beim Geflügel weniger verschiedene *spa*-Typen auf. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Anzahl an Brütereien in Europa sehr begrenzt ist und die meisten Küken aus der gleichen Brütereie stammen (Hasman et al., 2010).

Fetsch et al. (2009a) empfehlen, die Verbreitung von MRSA-Keimen in den verschiedenen Nutztierbeständen noch besser zu untersuchen, da die Kenntnisse über das Verhalten von MRSA in Nutztierherden und in der Lebensmittelkette bisher nicht ausreichen, um spezifische Bekämpfungsmaßnahmen zu begründen.

Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über den derzeitigen Stand der Kenntnisse zum Vorkommen von *spa*- und MLST-Typen bei MRSA-Keimen bei Nutztieren und Menschen.

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene *spa*-Typen und die zugeordneten MLST-Typen die bei Tieren und Menschen vorkommen

Isolations Ort	<i>spa</i> -Typ	MLST	Referenz
Schwein	t011	ST398	De Neeling et al., 2007; Khanna et al., 2008
	t034		Köck et al., 2009; Khanna et al. 2008
	t002	ST005	Khanna et al., 2008
	t2330		Van den Broek et al., 2008
Kühe, Kälber (Milch, Nasenabstriche)	t011	ST398	Spoehr et al., 2010
	t034		Fetsch et al., 2009b
Pferde	t011	ST398	Cuny et al., 2006; Cuny 2008; Cuny et al., 2009;
Geflügel	t011	ST398	Nemati et al., 2008; Dullweber, 2010
	t1456		Persoons et al., 2009
	t567		Nemati et al., 2008
	t034		Dullweber, 2010
	t002	ST005	Hasman et al., 2010; Fetsch et al., 2010
	t1430		Dullweber, 2010
Menschen	t011	ST398	Cuny, 2008
	t034	ST398	Khanna et al., 2008
	t2330		Van den Broek et al., 2008
	t002	ST5	Epidemologisches Bulletin, 2009

#### 2.1.4.2.2 MRS bei Haus- und Heimtieren

Über MRSA-Infektionen bei Hunden und Katzen gibt es zahlreiche Berichte (Rich et al., 2005; Strommenger et al., 2006; Guardabassi et al., 2004; Walther, 2007; Loeffler et al., 2005; Weese et al., 2007). Diese umfassen sowohl gesunde als auch klinisch kranke Hunde (Abbot et al., 2010). Ferner berichten Lilenbaum et al. (1998) über das Vorkommen von Methicillin-resistenten *S. intermedius* und Koagulase-negativen Staphylokokken bei klinisch gesunden Katzen und Guardabassi et al. (2003) über multiple Antibiotika-resistente *S. intermedius* Stämme bei Hunden mit Hautinfektionen und deren Übertragung auf ihre Besitzer.

Untersuchungen von Walther (2007) belegen, dass sich nosokomiale Infektionen durch MRSA in den veterinärmedizinischen Kliniken etabliert haben und dass von einer zeitweisen nosokomialen Verbreitung dieser Klone innerhalb dieser Einrichtungen ausgegangen werden

kann. So wurden in einer späteren Studie 61 *S. aureus*-Isolate von Haustieren aus einer deutschen Universitätsklinik auf MRSA untersucht, von denen 44,3% das *mecA*-Gen trugen und somit als MRSA klassifiziert werden können (Walther et al., 2008). Insgesamt wurde in dieser Studie die Mehrheit der MRSA-Isolate in Proben von Hunden und Katzen gefunden. Darüber hinaus erwiesen sich ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Schildkröte, eine Fledermaus und ein Papagei als MRSA-Träger.

Die durch MLST ermittelten Sequenztypen von MRSA-Isolaten bei Haustieren erwiesen sich als ST254, ST225, ST239, ST22 und ST8 mit den SCC*mec* Typen II und IV. Diese Haustier-Sequenztypen sind keine neuen genotypischen Linien, da diese schon häufig beim Menschen als MRSA in Erscheinung getreten sind und etablierten klonalen Komplexen angehören (Walther, 2007). Auch Leonard und Markey (2008) und Strommenger et al. (2006) kommen zu dem Schluss, dass die MRSA-Stämme, die bei Haustieren gefunden wurden, mit Epidemie-Stämme aus Krankenhäusern identisch sind.

#### **2.1.4.3 Bedeutung von MRS als Zoonoseerreger**

Zoonosen sind nach der Definition der WHO Infektionskrankheiten, die unter natürlichen Bedingungen zwischen Wirbeltieren und Menschen übertragen werden (<http://www.who.int/en/>). Bezogen auf MRSA ist die WHO-Definition bezüglich einer Zoonose erfüllt. Dies zeigt die mögliche Übertragung von MRSA-Keimen des Typs ST398 zwischen Schweinen und Menschen auf natürlichem Wege (Meemken et al., 2008). Weitere Beispiele für das Vorkommen derselben MRSA-Stämme bei Nutztieren und Kontaktpersonen wie Landwirten, Melker, Schlachthofpersonal oder Tierärzten liegen für Pferde (Weese et al., 2005; Cuny et al., 2006; Cuny, 2008; Walther et al., 2009), Kühe (Hummel und Witte, 1979; Kaszanyitzky et al., 2007; Spohr et al., 2010) sowie für Schweine vor (Van Loo et al., 2007; Meemken et al., 2008; Khanna et al., 2008; Lewis et al., 2008; Cuny et al., 2009; Frick, 2010). Aber nicht nur bei Nutztieren, sondern auch bei Haustieren wie Hunde und Katzen konnten dieselben MRSA- und MRKNS-Stämme bei den Tieren wie auch bei den Kontaktpersonen nachgewiesen werden (Strommenger et al., 2006; Guardabassi et al., 2003).

Vergleichende Untersuchungen von Personen, die häufigen Kontakt zu Schweinen hatten, wie Tierärzte mit Spezialisierung auf Schweine, und Personen, die weniger häufigen Kontakt zu Schweinen hatten, wie amtliche Fleischuntersucher, die wiederholt Kontakt zu Schweinen am Schlachtband hatten, ergaben deutliche Unterschiede des Nachweises von MRSA. So konnten bei den Tierärzten mit 36% deutlich höhere Nachweisraten an MRSA ST398 erzielt werden, als bei den amtlichen Fleischuntersuchern, die nur zu 14% MRSA-positiv waren (Meemken et al., 2008). Diese Untersuchungsergebnisse belegen, dass die MRSA-



Besiedlung mit ST398 auf einen intensiven Kontakt zu Schweinen zurückzuführen ist und andere Risikofaktoren, wie Antibiotikabehandlungen und Krankenhausaufenthalte, keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen (Meemken et al., 2008). So sind Landwirte und deren Familien, Tierärzte, Personen, die in der Tierproduktion als Dienstleister tätig sind, und Schlachthofpersonal, ein Personenkreis, der regelmäßig direkten Kontakt zu Nutztieren hat, als Risikogruppe in Hinblick auf Besiedlungen und Infektionen mit MRSA einzustufen (Fetsch et al., 2009a; Tenhagen et al., 2008).

Allerdings gilt der direkte Kontakt mit Schweinen und anderen Nutztieren nicht als die einzige MRSA-Quelle für den Menschen (Fetsch et al., 2009a). Tenhagen et al. (2008) rechnen auch Aerosolen und Emissionen aus Tierställen und Schlachthöfen eine mögliche Bedeutung bei der Übertragung von MRSA-Keimen zu. Ob dem Expositionsweg über die Abluft von Ställen derzeit eine Bedeutung zukommt, kann bisher nicht beantwortet werden. Berichte über das Vorkommen von MRSA in Stallluft und Staub liegen aber vor (Anon, 2008a; BfR, 2009; Spohr et al., 2010).

Die leichte Übertragbarkeit von MRSA-Keimen wird dadurch deutlich, dass der Einsatz von klassischen Schutzmaßnahmen, wie das Tragen von Masken oder Schutzkleidern, nicht generell zu einem verringerten Besiedlungsrisiko führt (Tenhagen et al., 2008). Das Risiko einer Übertragung von MRSA von gesunden Menschen zu anderen gesunden Menschen wird hingegen als vergleichsweise gering eingeschätzt (Tenhagen et al., 2008; Cuny et al., 2010).

Eine Zunahme der Besiedlung mit MRSA von Personen mit landwirtschaftlichen Berufen führt auch zu einem verstärkten Eintrag des Erregers in Risikobereiche wie Krankenhäuser und Pflegeeinrichtungen (Fetsch et al., 2009a; Tenhagen et al., 2008). Deshalb rät das Robert-Koch-Institut Patienten, die regelmäßig Kontakt zur landwirtschaftlichen Tiermast (Schweine) haben, sich vor Aufnahme in ein Krankenhaus mittels Nasenabstrich auf MRSA untersuchen zu lassen (Epidemiologisches Bulletin, 2008). Im Fall eines positiven Nachweises wird eine Behandlung mit Turixin-Nasensalbe<sup>®</sup> (Wirkstoff Mupirocin) nur vor einem anstehenden operativen Eingriffe empfohlen, da bei fortwährender beruflicher Exposition nach einer erfolgreicher Elimination der MRSA-Keime mit einer hohen Wiederbesiedlungsrate zu rechnen ist (Cuny et al., 2009; Empfehlungen des Robert Koch Instituts, 2009).

## 2.2 Enterokokken und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE)

### 2.2.1 Vorkommen und Bedeutung von Enterokokken

Enterokokken wurden lange Zeit der Familie *Streptococcaceae* zugeordnet, bis sie als eigene Familie abgetrennt wurden und heute der Familie der *Enterococcaceae*, Ordnung *Lactobacillales* innerhalb der Klasse der *Bacilli*, angehören (Kalka-Moll und Reinert, 2009). Enterokokken sind grampositive, Katalase-negative Bakterien, die in kurzen Ketten oder in Paaren gelagert vorkommen können. Sie weisen einen Durchmesser bis zu 2µm auf und können sich auch noch bei pH 9,6 in einem Medium mit 6,5% NaCl vermehren (Selbitz, 2007; Hof und Dörries, 2005; Kalka-Moll und Reinert, 2009). Sie sind fakultativ anaerob, wachsen bei Temperaturen zwischen 10 und 45°C, mit einem Optimum bei 35°C. Einige Enterokokken Spezies sind beweglich (Teixeira und Facklam, 2003).

Aufgrund unterschiedlicher hitzestabiler Zellwandpolysaccharide können Streptokokken mit Hilfe spezifischer Antikörper in sog. Lancefield-Gruppen (Lancefield, 1933) eingeteilt werden, die mit alphabetischen Buchstaben bezeichnet werden. Mittels RNA-Analysen konnten Schleifer und Kilpper-Baelz (1984) zeigen, dass *S. faecalis* und *S. faecium* sich von anderen Streptokokken so weit unterscheiden, dass eine neue Gruppe gebildet werden konnte. Daraufhin wurde *Streptococcus (S.) faecalis*, *S. faecium*, *S. avium* und *S. gallinarum* in *Enterococcus (E.) faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* und *E. gallinarum* umbenannt. Derzeit sind 40 verschiedene Enterococccen Spezies bekannt ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de); Mai 2010). Die wichtigsten Spezies sind *E. faecalis* und *E. faecium*, weitere Spezies sind *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* und *E. hirae* (Schleifer und Kilpper-Bälz, 1987).

#### Vorkommen beim Tier

Enterokokken kommen im Darm von Tieren und Menschen als Normalflora vor, so dass die Bedeutung einer Beteiligung an oder sogar Ursache von Darminfektionen schwer zu beurteilen ist. Anders sieht es dagegen bei Nachweisen bei extraintestinalen Entzündungen aus. So werden Enterokokken als Erreger von Pneumonien, Endokarditiden, Mastitiden, Urogenitalinfektionen und Septikämien bei Tieren beschrieben (Selbitz, 2007).

Beim Geflügel sind die dominierenden Enterokokken-Spezies im Darm *E. faecalis* und *E. faecium*. Des Weiteren konnten *E. hirae*, *E. durans* und *E. cecorum*, selten hingegen *E. avium* und *E. gallinarum* im Darm von Geflügel gefunden werden. Das Vorkommen von *E. faecalis* beim Geflügel hängt vom Alter der Tiere ab, wobei bei älteren Tieren die Prävalenz abfällt (Devriese et al., 1991).

Die Fähigkeit, Erkrankungen auszulösen, wird von der Abwehrlage der Puten sowie den Pathogenitätsfaktoren und Toxinen der Streptokokken bzw. Enterokokken bestimmt (Hafez

und Jodas, 1997). Enterokokken-Infektionen kommen hauptsächlich bei Jungtieren vor und können dort eine erhöhte Sterblichkeit, Sepsis, Enzephalomalazie, Veränderungen an Leber und Milz und Endokarditiden verursachen (Cardona et al., 1993; Hafez und Jodas, 1997; Chadfield et al., 2004). Die Übertragung erfolgt dabei oral, aerogen und selten durch Hautverletzungen. Die Verbreitung erfolgt über Bruteiinfektionen und horizontal durch direkten Kontakt von Tier zu Tier, aber auch indirekt über Vektoren wie kontaminiertes Futter, Trinkwasser und Nagetiere (Hafez und Jodas, 1997).

Zudem können Enterokokken auch in Untersuchungsmaterialien wie in Staub, Lebensmitteln, Wasser, Futtermitteln und Pflanzen nachgewiesen werden (Murray, 1990).

#### Vorkommen beim Menschen

*E. faecalis* und *E. faecium* machen beim Menschen bei ballast- und kohlenhydratreicher, fett- und eiweißarmer Ernährung bis zu 50% der aeroben Darmflora aus. *E. durans* und *E. casseliflavus* kommen dagegen viel seltener beim Menschen vor (Hof und Dörries, 2005).

Bei Infektionen mit Enterokokken ist *E. faecalis* mit etwa 80-90% aller Isolate die wichtigste humanpathogene Spezies, gefolgt von *E. faecium* mit etwa 10% der Laborisolate. Diese beiden Spezies sind nach Werner et al. (2008b) wichtige Erreger, da sie die dritt- und vierthäufigsten nosokomialen Erreger weltweit darstellen. Enterokokken kommen meist durch Wund- oder Katheterinfektionen, Infektionen der Harnwege oder des Darmes in den Körper. So treten Enterokokken in der Humanmedizin gehäuft im Zusammenhang mit Urinkathetern oder nach instrumentellen Eingriffen auf. Vor allem ältere Patienten erkranken an Enterokokken-bedingten Endokarditiden (Murray, 1990; Hof und Dörries, 2005; Kalka-Moll und Reinert, 2009). Der in den letzten Jahren zu beobachtende Anstieg an enterokokkenbedingten nosokomialen Infektionen hat nach Kalka-Moll und Reinert (2009) mehrere Ursachen. Zum einen spielt der vermehrte Einsatz von modernen Antibiotika mit fehlender Wirksamkeit gegen Enterokokken eine Rolle, die sogenannte „Enterokokkenlücke“ von zum Beispiel Fluorchinolonen und Cephalosporinen. Zum anderen gibt es eine deutliche Verschiebung der Patientenpopulation zu älteren, immunsupprimierten, schwer erkrankten Patienten, die eine erhöhte Empfänglichkeit für Infektionen mit diesen opportunistischen Erregern aufweisen.

#### Vorkommen im Lebensmittel

Enterokokken kommen häufig in Lebensmitteln wie Milch, Käse, Eiskrem und Fleisch vor (Jacobsen, 1963; Stiles et al., 1978; Thompson und Marth, 1986). Gemäß Untersuchungen von Stiles et al. (1978) ist die in Rind- und Schweinefleisch vorherrschende Enterokokken-Spezies *E. faecalis*, in verarbeitetem Fleisch ist es hingegen *E. faecium*. Bei Milch und Milchprodukten kommen vor allem *E. durans* und *E. faecium* vor, die als Fäulniskeime gelten

und z.B. durch ungenügende Reinigung der milchwirtschaftlichen Geräte eingetragen werden können (Thompson und Marth, 1986). Enterokokken spielen aber auch bei der Aromatisierung von Käse oder als Starterkulturen eine Rolle. So werden Enterokokken als Milchsäurebakterien zur normalen Reifungsflora von Käse gerechnet und produzieren dort typische Geschmackskomponenten (Centeno, 1996). Darüber hinaus wurden *E. durans*- und *E. faecium*-Keime mit hoher proteolytischer Aktivität in griechischem Käse als dominierende Mikroorganismen nachgewiesen (Tsakalidou et al., 1993).

In der Lebensmittelhygiene gelten Enterokokken als Indikatorkeime für Fäkalverunreinigungen. Knudtson und Hartman (1993) schlugen Enterokokkenkeimzahlen als Indikatoren für die Hygiene des Schlachtprozesses bei Schweinen und zur Festlegung von Critical Control Points im Rahmen von HACCP-Konzepten vor.

### **2.2.2 Antibiotikaresistenzen von Enterokokken**

Murray stellte bereits 1990 fest, dass die Medizin bald mit zunehmenden Zahlen von Enterokokken konfrontiert werde, für die es keine adäquate Therapie mehr gebe. Die Befürchtungen von Murray wurden insofern bestätigt, da im Jahr 2008 erneut festgestellt werden musste, dass zunehmend Antibiotika-Resistenzen bei *E. faecalis* und *E. faecium* auftraten, die das therapeutische Spektrum erheblich einschränken (Werner et al., 2008a).

Für die Entstehung von Antibiotika-Resistenzen bei Enterokokken wird zum einen der Antibiotika Einsatz in der Humanmedizin und zum anderen die Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen in der Nutztierhaltung verantwortlich gemacht (Ellerbroek et al., 2004).

Antibiotika-Resistenzen können entweder natürlich (intrinsisch) aufgrund einer chromosomalen Verankerung sein, sie sind damit nicht übertragbar und treten bei allen oder den meisten Stämmen einer Spezies auf. Die vorherrschende Ausprägung der intrinsischen Resistenz wird durch die Beschaffenheit der Zellwand vermittelt, die als Barriere das Eindringen des Antibiotikums in die Zelle verhindert. Die andere Variante einer Antibiotikaresistenz ist die erworbene, die an mobile genetische Elemente wie Plasmide oder Transposons gebunden ist und von Bakterium zu Bakterium übertragen werden kann. Diese Form der Antibiotikaresistenz entsteht meistens durch Mutationen und DNA-Transfer (Moellering und Krostadt, 1979; Ellerbroek et al., 2004). Eine Übersicht über die natürlichen und erworbenen Resistenzen von Enterokokken gibt die Tabelle 2 (Werner et al., 2008a).

Seitdem VRE eine intrinsische Resistenz gegenüber den meisten gebräuchlichen Antibiotika besitzen und die Fähigkeit haben, Resistenzen gegen die meisten der derzeit verfügbaren Antibiotika zu erwerben, haben sie einen selektiven Vorteil gegenüber anderen

Mikroorganismen und stellen deswegen eine große therapeutische Herausforderung dar (Cetinkaya et al., 2000).

Bis zum Auftreten von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) war Vancomycin praktisch das einzige Medikament, das konsequent für die Behandlung von Infektionen mit multiresistenten Enterokokken eingesetzt werden konnte (Cetinkaya et al., 2000). Da jetzt die meisten Vancomycin-resistenten Enterokokken multiresistent sind, wird oft die Bezeichnung GRE (Glykopeptid-resistente Enterokokken) oder VAAREF (Vancomycin-, Ampicillin- und Aminoglycosid- resistenter *Enterococcus faecium*) verwendet.

Tabelle 2: Übersicht über die natürlichen und die erworbenen Resistenzen von Enterokokken (Werner et al., 2008a)

Natürliche (intrinsische) Resistenz gegen	Erworbene Resistenz gegen
Cephalosporine	Tetracycline
Monobactame	Makrolide
Isoxazolympenicilline	Aminoglykoside (high level)
Aminoglykoside (low level)	Chloramphenicol
Lincosamide ( <i>E. faecalis</i> )	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol
Streptogramine ( <i>E. faecalis</i> )	Flurochinolone
Mupirocin ( <i>E. faecalis</i> )	Glykopeptide (vor allem <i>E. faecium</i> )
Vancomycin (low level; <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> )	Ampicillin (vor allem <i>E. faecium</i> ) Streptogramine ( <i>E. faecium</i> ) Oxazolidinone (Linezolid) Glycylcycline (Tigecyclin) Lipopeptide (Daptomycin)

### 2.2.2.1 Resistenzmechanismus

Die Glycopeptid-Antibiotika interagieren im Gegensatz zu den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika nicht mit Enzymen der Zellwandbiosynthese, sondern mit dem Enzym-Substrat. Diese bilden eine nicht-kovalente Bindung über mehrere Wasserstoffbrücken mit den beiden endständigen D-Alanyl-D-Alanin-Resten (D-Ala-D-Ala) der Peptidoglykanbausteine und dem Glykopeptid aus. Durch die Größe der gebundenen Glycopeptidmoleküle können die zellwandaufbauenden Enzyme, die Transpeptidase, die Transglycosidase und die D,D-Carboxypeptidase ihre Zielsequenzen nicht erreichen und die Zellwandbiosynthese wird gestoppt. Somit wird die Wirkung dieser Antibiotika nicht von der Affinität eines Zielenzym bestimmt, sondern durch

die Substratspezifität der Enzyme. Bedingt durch ihre voluminöse Struktur sind Glykopeptide gegen gramnegative Bakterien unwirksam, sie können die äußere Zellwand nicht durchdringen (Werner et al., 2008b; Courvalin, 2006; Schäfer et al., 1996).

Die Glykopeptid-Resistenz wird im Falle der erworbenen und der natürlichen Resistenz über eine Modifikation des Angriffsorts der Glykopeptide erreicht. Bei der Glykopeptid-Resistenz wird endständiges D-Alanin über eine modifizierte Biosynthese durch D-Lactat (Resistenzgene: *vanA*, *vanB*, *vanD*) oder D-Serin (Resistenzgene: *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL*) ersetzt. Im D-Lactat fehlt im Vergleich zu D-Alanin ein Wasserstoffatom zur Ausbildung der nicht-kovalenten Brückenbindung mit dem Glykopeptid-Antibiotikum. Dadurch sinkt das Bindungsvermögen von Vancomycin an der veränderten Zielstruktur um den Faktor 1000, mit dem Ergebnis einer phänotypischen Resistenz gegen Vancomycin (Werner et al., 2008 aus Jeffs und Nisbet, 1988; Sood et al., 2008). Derzeit sind sieben verschiedene Resistenzgencluster bekannt (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanL*, *vanG*, *vanC*) (Arthut und Courvalin, 1993; Quintiliani und Courvalin, 1996; Perichon et al., 1997; Fines et al. 1999; McKessar et al., 2000; Body et al. 2008). Namensgebend für den jeweiligen Resistenztyp ist nach Witte et al. (2008a) die entsprechende Ligase mit erweiterter Substratspezifität, wie z.B. die *vanA*-Ligase.

Der *vanA*-Genotyp bewirkt eine Hochresistenz „high level“ sowohl gegen Vancomycin (MHK: 16-100µg/ml) als auch gegen Teicoplanin (MHK: 4-512µg/ml). Verantwortlich für die Glykopeptidresistenz ist ein Gencluster, das sich auf dem konjugativ übertragbaren Plasmid *Tn1546* befindet und nur in Gegenwart von Glykopeptiden als sogenannter induzierter Resistenzmechanismus aktiviert wird. Dieses Gencluster enthält mehrere Gene, die für die Funktion entscheidend sind. Das sind das *vanH*-Gen, das eine Dehydrogenase kodiert, die Pyruvat zu D-Laktat reduziert, das *vanX*-Gen, das eine D,D-Dipeptidase kodiert, die D-Ala-D-Ala spaltet, und das *vanA*-Gen, welches eine Ligase kodiert, die schließlich D-Alanin und D-Laktat zu D-Ala-D-Lak verbindet. D-Ala-D-Lak ersetzt dann das Dipeptid D-Ala-D-Ala, so dass es durch das fehlende Wasserstoffatom im D-Lactat zur reduzierten Affinität von Vancomycin zu seiner Bindungsstelle kommt. Darüber hinaus enthält dieses Gencluster eine D,D-Carboxypeptidase (Resistenzgen *vanY*), welches das endständige D-Alanin vom Peptidoglykanbaustein abspaltet. Das Resistenzgen *vanZ*, ein Gen des *vanA*-Clusters, überträgt auf bisher noch nicht bekannte Weise eine „low-level“ Resistenz gegen Teicoplanin. Insgesamt wird die Peptidproduktion durch das *vanR*- und *vanS*-Regulationssystem kontrolliert, welche für die Transkription der Resistenzgene *vanA*, *vanH* und *vanX* verantwortlich sind. Der Ursprung des Gencluster liegt wahrscheinlich in glykopeptidbildenden Bakterien (Arthut und Courvalin, 1993; Nicolau et al., 1996; Arthur et al., 1996; Arthur et al., 1997).

Glykopeptidresistenzen vom *vanA*-Typ kommen am häufigsten bei *E. faecium* und *E. faecalis* vor, seltener bei *E. avium*, *E. durans*, *E. mundtii* und *E. raffinosus*. Aber auch *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* können neben den natürlich vorhandenen *vanC*-Genen das *vanA*-Gen erwerben (Dutka-Malen et al., 1994; Werner et al., 2008a). Die mittels In-vitro-Tests ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von Vancomycin können beim *vanA*-Typ mit (MHK: 16-100µg/ml) sehr hoch sein. Bei Teicoplanin schwanken die MHK-Werte zwischen niedrig und hoch (MHK: 4-512µg/ml) mit phänotypisch empfindlichen, intermediären und resistenten Ausbildungen (Werner et al., 2008a; Eom et al., 2004). Die durch das *vanA*-Gen vermittelte „high-level“ Resistenz besitzt unter den Enterokokken die weiteste Verbreitung (Arthur und Courvalin, 1993). Die anderen Glykopeptid Resistenzcluster ähneln in ihrem Aufbau und ihrer Funktion nach Werner et al. (2008a) dem *vanA*-Gencluster.

Der *vanB*-Genotyp vermittelt eine „low-level“ Resistenz gegen Vancomycin, bei dem die MHK-Werte meist einige Stufen unter denen für *vanA* liegen (MHK: 4-100µg/ml), bei gleichzeitiger Empfindlichkeit gegen Teicoplanin (MHK: 0,5-1µg/ml). Dieser durch Vancomycin induzierte Resistenzmechanismus kommt meistens bei *E. faecalis* und *E. faecium*, selten bei *E. durans* und *E. gallinarum* vor (Hyden et al., 1997; Werner et al., 2008a). Die genetischen Elemente, die die *vanB*-Glykopeptid-Resistenz vermitteln, sind *Tn1547*, *Tn1549* und *Tn5382*. Diese Gene sind oft chromosomal und nur selten auf einem Plasmid lokalisiert und teilweise übertragbar (Quintiliani und Courvalin, 1996; Carias et al., 1998; Garnier et al., 2000; Dahl et al., 2000). Anhand der DNA-Sequenzen kann das *vanB*-Gen in drei *vanB*-Subtypen *vanB1*, *vanB2* und *vanB3* unterteilt werden (Gold et al., 1993; Patel et al., 1998; Dahl et al., 1999; Dahl et al., 2000). Wobei das *vanB1*-Gen auch als *vanB*-Gen bezeichnet wurde (Dahl et al., 1999).

Die durch das *vanC*-Gen vermittelte Resistenz ist eine natürliche „low-level“ Resistenz, die nicht übertragen werden kann. Sie ist durch mäßige Empfindlichkeit bis schwacher Resistenz gegen Vancomycin (MHK: 2-32µg/ml) und eine Sensibilität gegen Teicoplanin (MHK: 0,5-1µg/ml) gekennzeichnet. Es sind drei Subtypen beschrieben, wobei der Subtyp *vanC1* nur bei *E. gallinarum* und die beiden Subtypen *vanC2* und *vanC3* bei *E. casseliflavus* vorkommen. Auch bei diesem Resistenzmechanismus wird die endständige Aminosäure ausgetauscht, es wird jedoch D-Alanin nicht durch D-Lactat ersetzt, sondern durch D-Serin. Dieser Resistenzmechanismus kann sowohl konstitutiv wie auch induzierbar vorkommen und ist chromosomal verankert (Arthur und Courvalin, 1993; Arias et al., 2000; Panesso et al., 2005).

Perichon et al. (1997) entdeckten als weiteres Resistenzgen das vanD-Gen, das eine erworbene „moderate-high level“ Vancomycin-Resistenz (MHK: 64µg/ml) und seltener eine „low level“ Teicoplanin-Resistenz (MHK: 4µg/ml) codiert. Die Aminosäuresequenz des *vanD*-Typs zeigt 69% Übereinstimmung mit dem *vanA*- und *vanB*-Typ und 43% Übereinstimmung mit dem *vanC*-Typ. Das *vanD*-Gen ist auf dem Chromosom lokalisiert und der Resistenzmechanismus gleicht dem des *vanA*- und *vanB*-Typs, indem ebenso D-Alanin durch D-Laktat ersetzt wird. Es besteht aber im Gegensatz zu den beiden anderen Typen keine Übertragbarkeit durch Konjugation (Perichon et al., 1997; Sood et al., 2008). Depardieu et al. (2009) konnten zwei verschiedenen Subtypen (*vanD1* und *vanD4*) des *vanD*-Gens bei *E. faecium*, *E. faecalis* und *E. avium* unterscheiden.

Das Vancomycin-Resistenzgen vanE wurde in einem *E. faecalis* Stamm mit einer „low level“-Vancomycin (MHK: 16µg/ml) und einer „low level“- Teicoplanin (MHK: 0,5µg/ml) Resistenz von Fines et al. (1999) zum ersten Mal beschrieben. Das Resistenzgen ist chromosomal verankert und die Expression ist induzierbar. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen haben größere Ähnlichkeiten mit denen des *vanC*-Gens (55%) als mit denen des *vanA*-Gens (45%), des *vanB*-Gens (43%) oder des *vanD*-Gens (44%) (Fines et al., 1999; Sood et al., 2008).

Ein weiteres Resistenzgen, das vanG-Resistenzgen, entdeckten McKessar et al. (2000) in einen *E. faecalis*-Isolat, das phänotypisch eine moderate Resistenz gegen Vancomycin (MHK: 16µg/ml) und eine volle Empfindlichkeit gegenüber Teicoplanin (MHK: 0,5µg/ml) aufwies. Die Aminosäuresequenz zeigte nur eine Übereinstimmung von 50% zu der Aminosäuresequenz von anderen *van*-Genen. Boyd et al. (2006) entdeckten in Kanada einen *E. faecalis* Stamm vom Subtyp *vanG2*. Dieses Resistenzgen ist auf dem Chromosom lokalisiert und dessen Expression ist induzierbar.

Eine Beschreibung des sog. vanL-Gens liegt bisher nur von Boyd et al. (2008) bei *E. faecalis* vor, das mit der Ausbildung einer „low level“ Vancomycin-Resistenz (MHK: 8µg/ml) verbunden ist. Das *vanL*-Gen ist chromosomal verankert und hat ein D-Ala-D-Ser Ligase-Produkt.



### 2.2.2.2 Resistenzevolution und Epidemiologie

Das für die Humanmedizin bedeutsame Reservoir von übertragbaren *vanA*- und *vanB*-Genen bei Enterokokken liegt eindeutig bei *E. faecium* (Vancomycin-resistente *E. faecium* VREF). Somit ist das VREF-Problem in der Humanmedizin aus ökologischer und nosokomialer Sicht ein VREF-Problem. Es ist aber unklar, warum die mobilen *vanA*- und *vanB*-Gene bevorzugt in *E. faecium* zu finden sind (Werner et al., 2008a).

Durch molekulare Typisierungen der Isolate konnte man feststellen, dass das vermehrte Auftreten von VREF auf verschiedene Entwicklungen zurückzuführen ist. Cluster von Infektionen und Besiedlungen sind häufig polyklonal/oligoklonal. Dies bedeutet, dass innerhalb eines lokal begrenzten ursprünglich polyklonalen Ausbruches die VREF-Keime ein identisches *vanA*-Gencluster (oligoklonal) über horizontalen Gentransfer erworben haben. Bereits entstandene Vancomycin-resistente *E. faecium*-Keime können sich dann zwischen den verschiedenen Krankenhäusern verbreiten (Handwerker et al., 1995; Kuhn 2005; Werner et al., 2008a und 2008c).

In der Tiermedizin gibt es nur wenige molekularbiologisch-epidemiologische Studien von isolierten VRE-Stämmen. In der Studie von Lemke (2003) zur Untersuchung von VRE-Isolaten (*vanA*- und *vanC*-Gen positiv) aus Geflügel- und Schweinefleisch wiesen diese eine beachtliche genotypische Heterogenität auf, was für eine Polyklonalität der VRE-Stämme spricht. Der Autor kommt deswegen zu dem Schluss, dass sich die Übertragung des *vanA*-Gens nicht nur auf genetisch eng miteinander verwandte Enterokokken-Spezies beschränkt (Lemcke, 2003).

In VRE-Isolaten aus tiermedizinischen Proben konnte nur sehr selten das *vanB*-Gen nachgewiesen werden (Woodford et al., 1995; Descheemaeker et al., 1999; Lemcke 2003; Portillo et al., 2003; Ellerbroek et al., 2004). Das *vanA*-Gen und die *vanC*-Gene können dagegen häufig detektiert werden (Khan et al., 2002; Lemcke, 2003; Ellerbroek et al., 2004). Eine große Gefahr liegt in der Verbreitung der Vancomycin-Resistenz-Gene auf andere grampositive Erreger. Dadurch würde der Therapieerfolg des Reserveantibiotikum Vancomycin zur Behandlung Enterokokken-bedingter Infektionen beim Menschen in Frage gestellt werden (Ellerbroek et al., 2004). Die Übertragung des *vanA*-Resistenzgens von Enterokokken auf *S. aureus* gelang bereits in vitro (Courvalin, 1990; Noble et al., 1992) wie auch in vivo durch das Auftreten klinischer Isolate, die das *vanA*-Resistenzgen trugen (Tenover, 2008; Zhu, 2008). Darüber hinaus wurden bereits Vancomycin-resistente klinische Isolate von *Clostridium innocum* (Mory et al., 1998), *Streptococcus bovis* (Poyart et al., 1997), *Oerskovia turbata* und *Arcanobacterium haemolyticum* (Power et al., 1995) nachgewiesen.

## 2.2.3 Nachweis von VRE

### 2.2.3.1 Isolierung, Identifizierung und Nachweis der *van*-Resistenzgene

In einem umfangreichen Forschungsprojekt wurde eine Methode zur Isolierung, Identifizierung und Resistenzbestimmung von Enterokokken, die aus Tupferproben von Schlachtkörpern, Kot und Halshäuten beim Geflügel isoliert worden sind, erarbeitet (Ellerbroek et al., 2004). Die Autoren verwendeten zum selektiven Nachweis von VRE-Keimen die Chromocult<sup>®</sup>-Enterokokken-Bouillon (Merck) als Voranreicherung und das Citrat-Azid-Tween-Carbonat (CATC) Nährmedium (Merck) mit Zusatz von 6mg/l Vancomycin als Selektivnährmediumplatte. Von jeder Selektivnährmediumplatte wurden nach der Inkubation bis zu drei verdächtige Kolonien auf Blutnährmediumplatten überimpft und mittels biochemischer Tests bestätigt. Die biochemischen Tests beinhalteten die Prüfung von Katalase, Pyrrolidonylarylamidase und Wachstum in Gegenwart von 6,5% NaCl.

Zusätzliche biochemische Parameter zur Identifizierung von Enterokokken beschreibt Ruoff (2003), darunter eine positive Pyrrolidonyl-Peptidase- und Leucin-Aminopeptidase-Aktivität, Wachstum bei 45°C und Hydrolyse von Äsculin in Gegenwart von 40% Galle. Zudem sind die Spezies *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* beweglich.

Der Nachweis von *van*-Genen ist mit Hilfe von PCR- oder Real-Time PCR-Methoden möglich (Werner et al., 2008a). In der Humanmedizin erfolgt der Nachweis der zwei bedeutendsten Resistenzgene beim Menschen, *vanA* und *vanB*, häufig mit Hilfe von Real-Time PCR Methoden (Huletsky et al., 2001; Fang et al., 2010; Bourdon et al., 2010). Für Tupferproben von Schlachtkörpern, Kot und Halshäuten beim Geflügel wurde eine klassische Multiplex-PCR entwickelt, die zum einen die Resistenzgene *vanA*, *vanB1*, *vanC1* und *vanC2* detektieren kann und zum anderen in den meisten Fällen zuverlässige Ergebnisse bei der Enterokokken-Spezies Differenzierung lieferte. In Einzelfällen auftretende zweideutige Befunde bei der Bestimmung der Spezies *E. faecium* mussten durch Einzel-PCR-Untersuchungen oder weiterführenden biochemischen Differenzierungsreaktionen geklärt werden (Mac et al., 2003; Ellerbroek et al., 2004).

## 2.2.4 Vorkommen und Bedeutung von VRE

### 2.2.4.1 VRE bei Menschen

Erstmals wurde 1988 über das Auftreten von Vancomycin-resistenten *E. faecalis*- und *E. faecium*-Keime bei Krankenhauspatienten in England berichtet (Uttley et al., 1988). Anschließend folgten Berichte über den Nachweis von VRE in Frankreich (Leclercq et al., 1988) und in verschiedenen Krankenhäusern im Nord-Osten der USA (Frieden et al., 1993). Seit der ersten Entdeckung haben sich VRE unerwartet schnell verbreitet und sind nun in den Krankenhäusern der meisten Staaten anzutreffen. Zudem wird zunehmend in Krankenhäusern von VRE-Epidemien berichtet (Boyce et al., 1995; Cetinkaya et al., 2000; Rice, 2001; Werner et al., 2008a). Deshalb wurden Vancomycin-resistente Enterokokken von Spera und Farber (1992) bereits zu Beginn der 1990er Jahre als die nosokomialen Infektionserreger in den USA bezeichnet. Auch im Rahmen des European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) konnte in einer 2009 erschienenen Surveillance-Studie festgestellt werden, dass es in den Jahren 2001 bis 2009 zu einem Anstieg an humanen, invasiven VRE-Keimen in Europa gekommen ist und dass die Bekämpfung von VRE nach wie vor eine Herausforderung darstellt (<http://www.rivm.nl/earss>; Mai 2010). Im Jahr 2008 nahmen VRE-Keime in Deutschland nach MRSA und ESBL (extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae) mit einer Häufigkeit von 12% sogar den dritten Platz der nosokomialen, multiresistenten Infektionserreger ein (Heudorf und Tessmann, 2008). Klinisch bedeutsam und mit Abstand am meisten verbreitet in der Humanmedizin sind dabei der *vanA*- und der *vanB*-Typ. Unter diesen beiden Resistenztypen dominiert der *vanA*-Typ, dessen Hauptvertreter *E. faecium* ist. So werden ungefähr 95% der VRE-Infektionen in Deutschland durch *E. faecium* und 5% durch *E. faecalis* verursacht (Heudorf und Tessmann, 2008; Werner et al., 2008b; Werner et al., 2008c).

Weiterführende molekularbiologisch-epidemiologische Studien haben gezeigt, dass im Gegensatz zu MRSA viele durch VRE bedingte Epidemien in deutschen und anderen Krankenhäusern einem einzigen klonalen Komplex mit der Bezeichnung CC17 zugeordnet werden können (Leavis et al., 2006; Werner et al., 2008c; Top et al., 2008; Rabbenstein 2008). Diese Stämme haben sich bestens an das krankenhausspezifische Umfeld adaptiert und einige dieser epidemischen Stämme besitzen die Möglichkeit, Virulenzfaktoren wie Hyaluronidase, Bacteriocine oder das Oberflächenprotein ESP (enterococcal surface protein) zu bilden. Darüber hinaus sind diese Stämme oft durch eine Ampicillin- und Chinolonresistenz gekennzeichnet (Willems und Bonten, 2007; Top et al., 2008).

Vancomycin-resistente Enterokokken werden in der Humanmedizin vor allem in Urin, Wundabstrichen, Stuhlproben, Bronchialsekret, Blut oder Sputum nachgewiesen (Heudorf

und Tessmann, 2008). Eine gastrointestinale Kolonisation erhöht das Risiko, an einer VRE-Infektion zu erkranken (Wells et al., 1995). Die Gefahr einer letalen VRE-Infektion wird vor allem dadurch deutlich, dass die Sterblichkeit bei Patienten, die an einer Bakteriämie mit VRE- im Vergleich zu vancomycinsensiblen Keimen erkrankt sind, 58 bis 70% erreichen kann (Boyce et al., 1994; Edmond et al., 1995; Edmond et al., 1996).

Als Risikofaktoren für eine Kolonisation mit VRE gelten Aufenthalte auf Intensivstationen, Blutgefäß- oder Harnwegskatheter, hochgradige Immunsuppression, Vorliegen eines Diabetes mellitus oder einer Krebserkrankung, Einnahme von Breitspektrum-Antibiotika sowie die Nähe zu mit VRE besiedelten oder infizierten Patienten (Rabbenstein, 2008; Heudorf und Tessmann, 2008).

In den USA können im Gegensatz zu Europa VRE fast ausschließlich in Krankenhäusern nachgewiesen werden. In Europa dagegen kann VRE auch bei gesunden Personen außerhalb von Krankenhäusern isoliert werden, die weder vor kurzem in Krankenhaus waren, noch Antibiotika erhalten haben. Diese Community-Infektionen sind extrem selten, sind aber wegen ihres auffällig ernsten Krankheitsverlaufs und der Gefahr des Eintrages in ein Krankenhaus besorgniserregend (Klare et al., 1995a; Bates, 1997).

Zudem konnten VRE (*vanA*-Typ) auch aus Abwasserproben verschiedener Kläranlagen isoliert werden, obwohl ein Selektionsdruck ausgehend aus den Krankenhäusern aus dieser Region aufgrund der sehr seltenen Anwendung entsprechender Antibiotika sehr unwahrscheinlich war (Klare et al., 1993; Klare et al., 1995a; Witte und Klare, 1995). Selbst im Klärschlamm konnte VRE isoliert werden (Kuhn et al., 2005; Sahlstrom et al., 2009). Aufgrund dieser weiten Verbreitung von VRE-Keimen wird diskutiert, ob der langjährige Einsatz des Antibiotikums Avoparcin in Europa als Leistungsförderer in der Tiermast zu einer Übertragung des kreuzresistenten Erregers über die Nahrungskette auf den Menschen geführt hat (Klare et al., 1995a; Bates, 1997; Lu et al., 2004). Kuhn et al. (2005) gehen dagegen davon aus, dass es zu einer Anreicherung von VRE in Abwassern von Krankenhäusern kommt, die dann über die kommunalen Abwasserkanäle in den natürlichen Wasserkreislauf abgegeben werden und dass VRE-Keime, die man im Klärschlamm und Oberflächengewässer findet, nicht von der landwirtschaftlichen Tierhaltung stammen.

## **2.2.4.2 VRE bei Tieren**

### **2.2.4.2.1 VRE bei Nutztieren**

Untersuchungen zu VRE bei Tieren konzentrieren sich hauptsächlich auf Nutztierbestände. Der Einsatz von Avoparcin als Leistungsförderer in der europäischen Schweine-, Hühner- und Putenmast hat möglicherweise zur Entwicklung von Kreuzresistenzen bei Enterococccen gegen Vancomycin und Teicolplanin geführt. Avoparcin gehört zur Gruppe der Glykopeptid-Antibiotika, die auch in der Humanmedizin eingesetzt werden. So gelten die Tierbestände als potenzielles Reservoir für Glykopeptid-resistente Enterokokken, die über tierische Nahrungsmittel auf den Menschen übertragen und in Krankenhäuser eingetragen werden können (Klare et al., 1995a; Klare et al., 1995b; Bager et al., 1997). Im Januar 1996 wurde daher von der Bundesregierung eine Dringlichkeitsverordnung mit einem Verwendungsverbot von Avoparcin als Zusatzstoff in der Tierernährung erlassen (Anon, 1996). Ein Jahr später entzog die EU diesem Leistungsförderer die Zulassung (Anon, 1997). Aus diesem Grund konzentrieren sich in Europa die meisten Studien auf eine mögliche Ausbreitung von VRE aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung über die Nahrungskette auf den Menschen. Allerdings ist noch kein schlüssiger Beweis für eine Übertragung von VRE über tierische Lebensmittel auf den Menschen verfügbar (Cetinkaya et al., 2000).

Bei einer Untersuchung von 115 Geflügel- und 50 Schweinefleischproben aus dem Zeitraum von Dezember 1995 bis Juni 1997, die sich somit auch auf einen Zeitraum nach dem Avoparcin-Verbot erstreckt, konnten noch recht viele VRE-Stämme nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen nach Ansicht von Lemcke (2003) den Schluss zu, dass Lebensmittel tierischen Ursprungs durch den Einsatz von Fütterungsantibiotika in der Tiermast als weitere Quelle für die Resistenz-Entwicklung angesehen werden müssen. Dies, obwohl mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) eindeutig nachgewiesen werden konnte, dass es keine enge genetische Beziehung zwischen den Isolaten aus tierischen Lebensmitteln und den klinischen Isolaten von Menschen gibt (Lemcke und Bülte, 2000; Lemcke, 2003). Auch Kotzamanidis et al. (2009) konnten mittels PFGE eindeutige genetische Unterschiede zwischen VRE-Stämme von Schweinen und von Menschen feststellen. So sprechen auch diese Erkenntnisse eher gegen eine direkte Übertragung von den gleichen VRE-Stämmen zwischen Tieren und Menschen. In einer weiteren deutschen Studie wurde zur Klärung möglicher Zusammenhänge zwischen Avoparcinverfütterung und dem Auftreten von Resistenzen Betriebe mit zwei unterschiedlichen Geflügelmast-Haltungsformen ausgewählt. Darunter Betriebe mit konventioneller Tierhaltung mit potentiell Einsatz von Avoparcin als Futtermittelzusatz (bis zu dessen Verbot) und

Betriebe mit ökologischer Tierhaltung ohne Anwendung von Fütterungsarzneimitteln. Es konnten sowohl in Proben konventionell als auch ökologisch geführter Betriebe VRE-Keime (Typ *vanA*) nachgewiesen werden. Erklärt werden diese Ergebnisse mit einer Kontamination über belebte oder unbelebte Vektoren oder mit der Persistenz von VRE-Keimen über Jahre in den Ställen (Richter, 1999).

Bei VRE Untersuchungen im Tierbereich muss unterschieden werden zwischen Proben von lebenden Tieren (Kot), von Schlachtkörpern oder von Fleisch.

Die meisten Untersuchungen hinsichtlich der Prävalenz von VRE bei Tieren wurden bei Schweinen und beim Geflügel durchgeführt, d.h. bei Tierarten, bei denen die Verfütterung von Antibiotika als Leistungsförderer die größte Rolle spielte. Es gibt aber auch Berichte über das Vorkommen von VRE-Keimen aus Milchproben von mastitiskranken Kühen (Khan et al., 2002; Kang et al., 2003), aus Kot von Kühen (Kang et al., 2003; Ellerbroek et al., 2004; Kuhn et al., 2005), Tupferproben frisch geschlachteter Masttiere (Rind und Schwein) (Ellerbroek et al., 2004) und aus Rinderhackfleisch (Klein et al., 1998).

#### Untersuchungen zum Vorkommen beim Geflügel

Der Nachweis von VRE beim Geflügel gelang sowohl bei Hühnern wie auch bei Puten.

So wiesen Khan et al. (2002) Enterokokken in Hühnermist nach, die die Resistenzgene *vanC1*, *vanC2* und *vanC3* trugen. Ellerbroek et al. (2004) untersuchten an deutschen Schlachthöfen Halshäute und Blinddärme von Geflügel und isolierten VRE-Keime, die Träger der Resistenzgene *vanA*, *vanC1* und *vanC2* waren.

Auch in anderen Studien wurden in Geflügelfleischproben und Kotproben von Hühnern und Puten Enterokokken mit den Resistenzgenen *vanA*, *vanC1*, *vanC2* und *vanC3* isoliert. Ein Isolat trug sogar gleichzeitig das *vanA*- und das *vanC1*-Gen (Lemcke und Bülte, 2000; Borgen et al., 2001; Khan et al., 2002; Lemcke 2003; Seo et al., 2005).

In einer umfangreichen schwedischen Studie im Jahr 2007 wurden Umwelt- und Caecalproben von Masthähnchen unterschiedlichen Alters nach Leerung der Ställe mit anschließender Reinigung aus drei Betrieben entnommen und auf VRE untersucht. Die Resistenz gegen Vancomycin wurde anhand von MHK-Werten bestimmt. Umweltproben wurden mittels Sockentupfer entnommen und am Schlachthof wurden frische Caecumporben gewonnen. Die Autoren stellten einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Kontamination der Umwelt und der Kolonisierung der Masthähnchen her. Weiterhin stellten sie fest, dass VRE auch nach Reinigung in den leeren Ställen nachweisbar war. So stieg in allen Betrieben der Grad der Kontamination während der Mast erst an und sank nach der Reinigung wieder ab. Allerdings reichte eine geringe verbleibende Kontamination mit VRE-

Keimen im Stall am Anfang der Mast aus, um im Laufe der nachfolgenden Mastperiode zunehmend mehr Tiere mit VRE zu belasten (Nilsson et al., 2009).

In der oben bereits beschriebenen deutschen Studie in fünf konventionellen und sechs ökologischen Geflügelmastherden wurden Kotproben, Futterproben, Tränkeproben sowie Staubproben entnommen. Zudem wurden am Schlachthof Abstriche der Transportkisten, der Kloaken, der Brühmaschine, des Rumpfmaschinenabwassers und Abstriche von Schlachtierkörpern entnommen. Dies ergab insgesamt 223 Proben, von denen 134 (60,1%) phänotypisch als VRE-positiv eingestuft wurden. Von diesen 134 phänotypisch VRE-positiven Isolaten wurden nur 50 Isolate mittels PCR auf das Vorkommen des *vanA* Resistenzgens überprüft und 48 konnten eindeutig als Träger des *vanA*-Resistenzgens identifiziert werden. Die anderen Isolate wurden auf der Grundlage des Wachstums auf einem mit Vancomycin supplementierten CATC-Agar als VRE-positiv eingestuft (Richter, 1999).

#### Untersuchungen zum Vorkommen bei Schweinen

Nachweise von VRE-Keimen, die die Resistenzgene *vanA*, *vanC1* und *vanC2/3* trugen, gelangen in Kotproben oder Rektaltupfern von Schweinen aus zahlreichen Ländern wie Spanien, Schweden, Korea, Italien, Costa Rica, Deutschland, Norwegen, Dänemark und Japan (Kruse et al., 1999; Bustamante et al., 2003; Peters J., 2003; Sakai et al., 2003; Kuhn et al., 2005; Seo et al., 2005; de Niederhäusern et al., 2007).

Peters (2003) konnte bei 9% der *E. faecium*-Isolate, gewonnen aus Tupferproben von Schweineschlachtkörpern und aus Rektumtupferproben von Schweinen aus Deutschland, das *vanA*-Gen nachweisen. Auch Ellerbroek et al., 2004 untersuchten in einer Studie von 2000 bis 2002 an deutschen Schlachthöfen 97 Tupferproben von Schlachtkörperoberflächen von frisch geschlachteten Mastschweinen und Kotproben auf VRE (Resistenzgene *vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2*). Hierbei konnten VRE-Isolate mit den Resistenzgenen *vanC1* und *vanC2* isoliert werden.

Eine weitere deutsche Studie untersuchte 50 Schweinefleischproben (Bratwurst, Schweinemett) auf VRE, es wurde allerdings kein *vanA*- oder *vanB*-Gen-positives Enterokokken-Isolat gewonnen, jedoch ein *vanC1*-Gen-, 4 *vanC2*-Gen- und 3 *vanC3*-Gen- positive Isolate (Lemcke, 2003).

In einer europaweiten Studie unter Einbeziehung von Kot-, Gülle- und Ceacal-Proben von Schweinen konnte festgestellt werden, dass in Schweden (Verbot Avoparcin-Anwendung seit 1986) weniger VRE-Isolate auftraten als in Spanien, wo Avoparcin noch bis vor kurzem eingesetzt wurde. Obwohl die meisten VRE-positiven Proben im Kot spanischer Schweine isoliert werden konnten, konnten die Autoren keine positiven Proben von Pflanzen in Spanien erzielen, die mit Schweinegülle gedüngt worden waren (Kuhn et al., 2005).

Portillo et al. (2003) wiesen zum ersten Mal das *vanB2*-Gen aus einer Kotprobe von Schweinen nach.

#### **2.2.4.2.2 VRE bei Haustieren**

Berichte über VRE bei Haustieren gibt es nur sehr wenige. So wurden in einer Studie in Portugal 147 Kotproben von Haustieren auf VRE untersucht. Ein Isolat erwies sich als *vanA*-Gen positiv (0,68%) und vier Isolate erwiesen sich als *vanC1*-Gen positiv (2,72%) (Poeta et al., 2008). Eine andere Studie untersuchte 22 Kotproben von Haustieren in Spanien und isolierte fünf *vanA* positive Enterokokken (2,5%) (Portillo et al., 2003). Beide Studien beschreiben nicht, um welche Art von Haustieren es sich handelt.

Pressel et al. (2005) dagegen berichten über eine zwölf Jahre alte Katze mit einer Cholangiohepatitis, verursacht durch VRE. Eine zehn Tage lange Behandlung mit Vancomycin erbrachte keine Heilung der bakteriellen Cholangiohepatitis, selektierte aber vielleicht die resistenten Keime heraus, weswegen die Autoren im nachhinein feststellen, dass die Vancomycin Behandlung bei dieser Katze wohl unangebracht war und die Katze mit VRE kolonisiert blieb.

Vom ersten Vancomycin-resistenten *E. faecium* (*vanA*-Gen positiv) Keim eines Hundes mit Harnwegsinfektion in den Vereinigten Staaten berichten Simjee et al. (2002). Die Sequenzanalyse ergab eine besondere Form von *Tn1546*, die bis jetzt nur in klinischen VRE Isolaten aus der Humanmedizin in den Vereinigten Staaten isoliert wurde, weswegen eine Übertragung von Mensch zu Tier möglich erscheint.

#### **2.2.4.3 Bedeutung von VRE als Zoonoseerreger**

Eine Übertragung resistenter Mikroorganismen von Tieren auf den Menschen kann sowohl durch direkten Kontakt als auch durch tierische Lebensmittel stattfinden (Ellerbroek et al., 2004). So kommen auch Vancomycin-resistente Enterokokken aus Lebensmitteln tierischer Herkunft als Quelle einer Übertragung auf den Menschen in Betracht (Klare et al., 1995a; Klare et al., 1995b; Bager et al., 1997; Franz et al., 1999). Zudem können Enterokokken mit Antibiotika-Resistenzgenen, diese Resistenzgene auch auf autochthone Enterokokken-Populationen in dem Magen-Darm-Trakt von Menschen übertragen, auch wenn diese nicht zwangsläufig den Wirt kolonisieren (Descheemaeker et al., 1999; Ellerbroek et al., 2004). Hierzu gibt es Studien, die mit Hilfe von PFGE Analysen belegen, dass die gleichen oder sehr ähnliche VRE Stämme sowohl bei Geflügel als auch deren Haltern oder bei Geflügel und Schweinen sowie Isolaten aus dem humanmedizinischen-klinischen Bereich auftreten



(Stobberingh et al., 1999; Descheemaeker et al., 1999; Simonsen et al., 1998; Johnsen et al., 2005). Andere Studien dagegen belegen durch PFGE Analysen, dass VRE-Isolate aus der Tierhaltung und von Lebensmitteln tierischen Ursprungs deutlich von den VRE-Isolaten aus dem humanmedizinisch-klinischen Bereich abzugrenzen sind (Descheemaeker et al., 1997; Descheemaeker et al., 1999; Lemcke, 2003; Perri et al., 2003; Kolar et al., 2005; Seo et al., 2005; Kotzamanidis et al., 2009; Sahlstrom et al., 2009). Mit Hilfe der Anwendung der Technik des Amplifield-Fragment Length Polymorphism (AFLP) des *Tn1546*-Gens (*vanA* Transposon) von Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten (VREF) konnte gezeigt werden, dass VREF-Keime in vier AFLP-Genogruppen eingeteilt werden können, die auf eine Wirtsspezifität von Subtypen hinweist. Die VREF-Isolate von nicht hospitalisierten Patienten wurden dabei mit den VREF-Isolaten von Schweinen der Genogruppe A zugeteilt. Hühner- und Puten-Isolate wurden der Genogruppe B zugeteilt. Die Gruppe C beinhaltet Isolate von hospitalisierten Patienten, Kälbern, Katzen und Hunden. Und die Gruppe D wurde ausschließlich aus Isolaten von Kälbern gebildet. Dies deutet darauf hin, dass Heimtiere und Kälber eine potenzielle Quelle von VREF-Stämmen für Krankenhauspatienten darstellen und dass dieselben VREF-Stämme bei nicht hospitalisierten Patienten und Schweinen vorkommen. Stämme, die dem Genotyp B und D angehören, wurden dagegen nicht bei Menschen isoliert. Diese Untersuchungen zeigen, dass es sehr schwierig ist, eine genetisch-epidemiologische Beziehung zwischen Isolaten verschiedenen Ursprungs herzustellen (Willems et al., 2000; Lemcke, 2003). Kuhn et al. (2005) dagegen gehen davon aus, dass VRE von Menschen und Tieren zum größten Teil zu getrennten Genotypen gehören und dass sich diese zwei Linien weitgehend aus zwei verschiedenen Richtungen entwickelt haben.

Neben der Gefahr der Übertragung von Resistenzgenen unter den Enterokokken besteht zusätzlich die Gefahr der Übertragung der Vancomycin-Resistenz-Gene auf andere grampositive Erreger. Dies hätte den Verlust der Wirksamkeit von Vancomycin als Reserveantibiotikums zur Folge mit verheerenden Auswirkungen auf die Behandlung bakterieller Infektionen beim Menschen (Ellerbroek et al., 2004).

## **3 Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Material MRS und VRE**

#### **3.1.1 Untersuchte Betriebe und Tierhalter**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 200 Puten aus insgesamt 20 Mastbetrieben der Landkreise Schwäbisch Hall, Rems-Murr und Hohenlohe des Regierungsbezirks Stuttgart in Baden-Württemberg auf MRSA- und VRE-Keime untersucht. Diese drei Landkreise sind mit 537559, 38539 und 68971 gehaltenen Puten pro Landkreis die putenstärksten Landkreise im Regierungsbezirk Stuttgart ([www.statistik.baden-wuerttemberg.de](http://www.statistik.baden-wuerttemberg.de), Februar 2011). Die Auswahl der Betriebe erfolgte zufällig. Die Proben von Puten wurden zwei Wochen bis ein Tag vor der Schlachtung der Tiere entnommen. Die beprobten weiblichen Tiere waren somit 14 bis 16 Wochen alt und die beprobten männlichen Tiere 18 bis 20 Wochen.

Zudem wurden von 20 Betrieben drei Personen beprobt, zwei Personen die sich am häufigsten im Putenstall aufhalten und eine Person, die sich nie oder nur selten im Putenstall aufhält.

#### **3.1.2 Probenmaterial**

Von den 20 Betrieben hatten zehn Betriebe männliche und zehn Betriebe weibliche Tiere eingestellt. In jedem Betrieb wurden 10 Tiere zufällig ausgewählt, von denen jeweils ein Trachealtupfer für den MRSA-Nachweis und zwei Kloakentupfer jeweils für den Nachweis von MRSA- oder VRE-Keimen entnommen wurden.

Neben den Tierproben wurden in jedem Betrieb für den MRSA- und den VRE-Nachweis zweimal fünf Staubtupfer entnommen. Genaueres zu der Entnahme sowie zu der Lokalisationen der Tupferentnahmen sind Kapitel 3.4.1 Probenentnahme in den Betrieben aufgeführt.

#### **3.1.3 Fragebogen**

Jeder Landwirt erhielt bei der Probenentnahme einen Aufklärungs- und Fragebogen (siehe Anhang, Fragebogen Teil 1 und Teil 2). Mit dem Aufklärungs- und Fragebogen wurden die Landwirte über das Thema MRSA und die Probenentnahme in ihrem Betrieb aufgeklärt. Außerdem wurden Daten über den Betrieb, die Haltungsform der Tiere und die beprobten Personen festgehalten.

### 3.1.4 Statistik

Im Rahmen der Untersuchungen zur Besiedlung von Personen mit MRSA wurde der sog. OR-Wert (Chancenverhältnis) (Bender und Lange, 2007) mit Hilfe des Statistikprogramms Win Episcope 2.0 (Thrusfield et al., 2001) berechnet.

## 3.2 Material MRS

### 3.2.1 Material für die mikrobiologische Untersuchung von Feldproben

#### 3.2.1.1 Bakterienkulturen

Die in die Untersuchungen einbezogenen Referenzstämme und Feldisolate sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit für den MRSA-Nachweis verwendeten Referenzstämme und Feldisolate

Spezies	Bezeichnung	Merkmal
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 11729	<i>mecA</i> -positiv
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	<i>mecA</i> -negativ
<i>Staphylococcus aureus</i>	Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 15215	<i>mecA</i> -positiv
<i>Staphylococcus aureus</i>	Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 15214	<i>mecA</i> -positiv
<i>Staphylococcus aureus</i>	Feldisolat LGA Stuttgart 07LGA 00460	<i>mecA</i> -positiv

#### 3.2.1.2 Stammerhaltung und Kultivierung

Zur kurzfristigen Aufbewahrung von Kulturen bis zu einer Woche wurden gekühlte Blutagarplatten mit 5% Schafblut verwendet. Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte in Cryobank™-Kryoröhrchen bei -70°C.

### 3.2.1.3 Nährmedien und Reagenzien

Die zur Erstellung der Arbeit verwendeten Nährmedien wurden im CVUA Stuttgart nach den Anweisungen der Hersteller produziert und bei 4-7°C bis zur Verwendung, maximal 4 Wochen später, gelagert. Die benötigten Materialien und Fertignährmedien wurden über die aufgeführten Firmen bezogen. Das für die Herstellung flüssiger oder fester Nährmedien verwendete Wasser wurde mit Hilfe des Gerätes Milli-Q Synthesis der Fa. Millipore (Schwalbach) hergestellt.

- **Müller-Hinton-Bouillon mit 6,5% NaCl**  
Müller-Hinton-Bouillon (Merck, Darmstadt, 1.10293.0500)  
Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe, 9265.3)
- **Trypton-Soja-Bouillon mit Zusatz von Cefoxitin und Aztreonam**  
Trypton-Soja-Bouillon (Oxoid, Wesel, CM0129)  
Cefoxitin sodium salt 3,5 mg/l Bouillon (Fluka, Taufkirchen, C4786)  
Aztreonam solid 75 mg/l Bouillon (Fluka, Taufkirchen, A6848)
- **MRSA-Ident-Agar**  
(Heipha, Eppelheim, 1348e)
- **Blut- Agar**  
Blut-Agar-Basis (Oxoid, Wesel, CM55)  
Agar-Agar (Becton Dickinson, Heidelberg, 0140)  
5% steriles defibriniertes Schafblut (Oxoid, Wesel, SR0051C)

### 3.2.1.4 Materialien

- **Einmal- Reagenzgläser aus Glas**  
(Karl Hecht Assistent GmbH, Sondheim/Rhön, 2769/16)
- **Schraubflaschen Glas 250ml**  
(DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, 218013651)
- **Plastikpetrischalen**  
(Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, 633180)
- **Pasteur Pipetten**  
(Hirschmann® Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, 9250101)
- **Pipetierball**  
(Roth, Karlsruhe, C260.1)

- **Einmal-Plastikösen**  
gelbe Stichösen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, 731180)  
Impfeschlingen blau 10µl (nunc™, Langensfeld, 254437)  
Impfeschlingen weiß 1µl (nunc™, Langensfeld, 254410)
- **Pipettenspitzen**  
Biosphere® Filter Tips 1000µl blue (Sarstedt AG &CO, Nümbrecht, 70.762.211)  
Biosphere® Filter Tips 100µl yellow (Sarstedt AG &CO, Nümbrecht, 70.760.212)  
Biosphere® Filter Tips 10µl natural (Sarstedt AG &CO, Nümbrecht, 70.1116.210)
- **Objektträger**  
Super Frost® GELB (R. Langenbrinck, Emmendingen, 4201888)
- **Einmal-Handschuhe**  
Gentle Skin® sensitive (Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden, 1221)  
Unigloves® Expert plus (Unigloves GmbH, Troisdorf, B 0325)
- **Tupfer**  
Mediumtupfer Bakteriette® (EM-TE-Vertrieb, Hamburg, 510 klar)  
Tupfer Bakteriette® (EM-TE-Vertrieb, Hamburg, 169 Cotton)  
Tupfer Bakteriette® (EM-TE-Vertrieb, Hamburg, 161 Rayon)

### 3.2.1.5 Geräte und Computerprogramme

- **Vortexer**  
(IKA Labortechnik, Staufen, VF2)
- **Kühl- und Gefrierschränke**  
Premium Kühlschrank (Liebherr, Biberach an der Riss, 161664)  
Comfort Kühlschrank (Liebherr, Biberach an der Riss, 410934)  
Gefrierschrank (GFL, Burgwerden, 6485)
- **Brutschrank**  
(Memmert GmbH + CO. KG, Schwabach, UM 200)
- **Sicherheitswerkbank**  
Holten LaminAir (Heto- Holten AIS, Allerød Dänemark, S-20101.8)
- **Kolbenhubpipetten**  
0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl (Eppendorf, Hamburg)
- **Bunsenbrenner**  
Teclubrenner für Erdgas (Bochem® Instrumente GmbH, Weilburg, 7400)  
Gasprofii SCS (WLD-TEC GmbH, Göttingen, 6.1.3.000)

- **pH-Meter**  
(WTW, Weilheim i. OB, PH521)
- **Analysenwage**  
(Sartorius AG, Göttingen, BP21005)
- **Sterilisatoren**  
Varioklav (H+P, Unterschleißheim, VI500T)  
Agarclav (Integra, Fernwald, 132.961203)
- **Petrischalenkarussell**  
PourMatic (New Brunswick Scientific, New Jersey USA, MP-100)
- **Wasserbad**  
(Memmert GmbH + CO. KG, Schwabach, WBU45)
- **Dampftopf**  
(Frtiz Gössner, Hamburg, DT630)
- **FT-IR-Spektrometer**  
(Bruker Optics, Ettlingen, IFS 28/B)
- **Probenrad aus ZnSe**  
(Bruker Optics, Ettlingen)
- **Exsikator mit Vakuumpumpe**  
(Bruker Optics, Ettlingen, L 21220)
- **Vibrierende Platinöse**  
3D pulsating toothbrush (Braun GmbH, Kronberg, 4729)
- **PC-Programm Opus-Software**  
(Bruker Optics, Ettlingen, Version 4.2)
- **PC-Programm NeuroDeveloper**  
ND (Synthon, Heidelberg, Version 2.5b)

## 3.2.2 Material für den molekularbiologischen Nachweis von Resistenzgenen mittels Real-Time PCR

### 3.2.2.1 Reagenzien und Lösungen für die Real-Time PCR

- **Wasser**  
(Sigma, Deisenhofen, W4502-1L)
- **Tris-EDTA Puffer**  
100x konzentriert; 1M Tris-HCl, pH 8,0 mit 0,1M EDTA  
(Sigma, Deisenhofen, T-9285)
- **Master Mix**  
SYBR Green PCR Master Mix (Eurogentec, Seraing Belgien, RT-SN2X-03WOU+)
- **Aufreinigungs Kit**  
QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, 28104)  
GelExtraktion Kit (QIAGEN, Hilden, 28704)
- **Nuklease-Free-Water**  
(Promega, Mannheim, 188616)
- **Isopropanol**  
(Fluka, Taufkirchen, 59304)
- **Primer-Sequenzen**  
Oligonukleotide 100µM in Wasser aufgelöst (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Tabelle 4: Übersicht über die Primersequenzen der selbst designten MRSA Real-Time PCR

Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')	Länge des Amplifikats
F-MRSA	TGAAAAATGATTATGGCTCAGGTACT	81
R-MRSA	CATATGAAGGTGTGCTTACAAGTGC	

F = Vorwärtsprimer (forward primer), R = Rückwärtsprimer (reverse primer)

### 3.2.2.2 Geräte und Computerprogramme

- **Thermocycler**  
ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt, 270001525)  
Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, 533105328)
- **Thermoblock**  
ThermoStatplus 2ml (Eppendorf, Hamburg, 535200066)
- **PCR- Werkbank**  
Biocap<sup>™</sup> RNA/DNA (Captair, Köln, 108 2003)
- **Vortex-Schüttler**  
Heidolph Reax Top (Labfish, Aumühle, 1200-210-05)
- **Zentrifugen**  
Tischzentrifuge (Roth, Karlsruhe, 036838)  
Zentrifuge Rotixa/AP (Hettich, Tuttlingen, 4202)  
Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, 5415R)
- **Kolbenhubpipetten**  
0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl (Eppendorf, Hamburg)
- **Pipettenspitzen**  
Biosphere<sup>®</sup> Filter Tips 1000µl blue (Sarstedt, Nümbrecht, 70.762.211)  
Biosphere<sup>®</sup> Filter Tips 100µl yellow (Sarstedt, Nümbrecht, 70.760.212)  
Biosphere<sup>®</sup> Filter Tips 10µl natural (Sarstedt, Nümbrecht, 70.1116.210)
- **Reaktionsgefäße**  
Safe-Lock Tubes PCR clean 2,0ml; 1,5ml; 0,5ml (Eppendorf, Hamburg, 0030.123.344)
- **Mikrotiterplatten**  
Thermo-Fast<sup>®</sup> 96 (Thermo Scientific, Schwerte, AB-0600)
- **Rack für Reaktionsgefäße**  
Top-Rack (neoLab, Heidelberg, 2-2561)
- **Optische Klebefolien für die PCR-Mikrotiterplatten**  
ABI PRISM<sup>®</sup> Optical adhesive Covers (Applied Biosystems, Darmstadt, 95.1994)
- **Mikro-Schraubröhre**  
(Sarstedt, Nümbrecht, 72.692.005)
- **NCBI Datenbank**  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



- **Primer-Design-Programm**

Primer Express V 2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt)

### 3.3 Material VRE

#### 3.3.1 Material für die mikrobiologische Untersuchungen von Feldproben

##### 3.3.1.1 Bakterienkulturen

Die in die Untersuchung einbezogenen Referenzstämme und Feldisolate sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit für den VRE-Nachweis verwendeten Referenzstämme und Feldisolate

<b>Spezies</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Resistenzgen</b>
<i>Enterococcus faecium</i>	BM 4147	<i>vanA</i> -positiv
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	<i>vanB</i> -positiv ( <i>vanB1</i> )
<i>Enterococcus faecium</i>	UAA 522	<i>vanB</i> -positiv ( <i>vanB1</i> )
<i>Enterococcus faecium</i>	BM 4524	<i>vanB2</i> -positiv
<i>Enterococcus faecalis</i>	BM 45	<i>vanB3</i> -positiv
<i>Enterococcus gallinarum</i>	BM 4174	<i>vanC1</i> -positiv
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	ATCC 25788	<i>vanC2</i> -positiv
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	<i>van</i> -negativ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DSM 6784	<i>van</i> -negativ
<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidermicus</i>	Feldisolat CVUA Stuttgart 63VarJ1	<i>van</i> -negativ

##### 3.3.1.2 Stammerhaltung und Kultivierung

Zur kurzfristigen Aufbewahrung von Kulturen bis zu einer Woche wurden gekühlte Blutagarplatten mit 5% Schafblut verwendet. Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte in Cryobank™-Kryoröhrchen bei -70°C.

### 3.3.1.3 Nährmedien und Reagenzien

Die zur Erstellung der Arbeit verwendeten Nährmedien wurden in der Nährbodenküche des CVUA Stuttgart nach den Anweisungen der Hersteller produziert und bei 4-7°C bis zur Verwendung, maximal 4 Wochen später, gelagert. Die benötigten Materialien und Fertignährmedien wurden über die aufgeführten Firmen bezogen. Das für die Herstellung flüssiger oder fester Nährmedien verwendete Wasser wurde mit Hilfe des Gerätes Milli-Q Synthesis der Fa. Millipore (Schwalbach) hergestellt.

- **Chromocult Enterokokken-Bouillon**  
(Merck, Darmstadt, 1.10294.0500)
- **Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar mit Vancomycin**  
(nach Angaben von Ellerbroek et al., 2004)  
Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (Merck, Darmstadt, 1.05222.0500)  
Vancomycin hydrochlorid 6mg/l (Sigma, Steinheim, V2002-100MG)
- **Blut- Agar**  
Blut-Agar-Basis (Oxoid, Wesel, CM55)  
Agar-Agar (Becton Dickinson, Heidelberg, 0140)  
5% Steriles defibriniertes Schafblut (Oxoid, Wesel, SR0051C)
- **CATC-Agar**  
(Heipha, Eppelheim, 2190e)
- **Blut-Glucose-Äsculin Agar**  
Caso-Agar (Merck, Darmstadt, 1.05458)  
D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck, Darmstadt, 1.08342)  
Äsculin (Merck, Darmstadt, 1.00842)  
Steriles defibriniertes Schafblut (Oxoid, Wesel, SR0051C)
- **CASO-Bouillon mit 6,5% NaCl**  
CASO-Bouillon (Merck, Darmstadt, 1.05459)  
Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe, 9265.3)
- **SIM-Medium mit TTC**  
SIM-Medium (Becton Dickinson, Heidelberg, 211578)  
2,3,5 Triphenyltetrazoliumchlorid 0,05g/l Medium (Merck, Darmstadt, 1.08380)
- **PYR-Test**  
Oxoid Biochemisches Identifizierungs-System O.B.I.S. (Oxoid, Wesel, ID580M)
- **LAP-Test**  
LAP Test Kit (Remel, Kansas USA, R30168501)

### **3.3.1.4 Materialien**

Die für mikrobiologischen Untersuchungen auf VRE verwendeten Materialien entsprechen denen der mikrobiologischen Untersuchungen auf MRSA (s. Kapitel 3.2.1.4 Materialien).

### **3.3.1.5 Geräte und Computerprogramme**

Die zur mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen auf VRE verwendeten Geräte entsprechen denen der mikrobiologischen Untersuchung auf MRSA-Keime (s. Kapitel 3.2.1.5 Geräte und Computerprogramme).

## **3.3.2 Material für den molekularbiologischen Nachweis von Resistenzgenen mittels Real-Time PCR**

### **3.3.2.1 Reagenzien und Lösungen für die Real-Time PCR**

- **Wasser**  
(Sigma, Deisenhofen, W4502-1L)
- **Tris-Puffer**  
100x konzentriert; 1M Tris-HCl, pH 8,0 mit 0,1M EDTA  
(Sigma, Deisenhofen, T-9285)
- **Master Mix**  
SYBR Green PCR Master Mix (Eurogentec, Seraing, Belgien, RT-SN2X-03WOU+)
- **Aufreinigungs Kit**  
QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, 28104)  
GelExtraktion Kit (QIAGEN, Hilden, 28704)
- **Nuklease-Free-Water**  
(Promega, Mannheim, 188616)
- **Isopropanol**  
(Fluka, Taufkirchen, 59304)
- **Primer-Sequenzen**  
Oligonukleotide 100µM in Wasser aufgelöst (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Tabelle 6: Übersicht über die Primersequenzen der selbst designten VRE Real-Time PCR

Primer	Nukleotidsequenz (5`-3`)	Länge des Amplifikats
F- <i>vanA</i>	TGCACGGATTACTTGTTAAAAAGAA	81
R- <i>vanA</i>	ACTTGCCATGCAAAGCTGAA	
F- <i>vanB1/2/3</i>	AGCAAGCGATTTTCGGGC	81
R- <i>vanB1/2/3</i>	TTTGATCCACTTCGCCGAC	
F- <i>vanC1</i>	AATTGACGATTGGTGCTTGTGAT	82
R- <i>vanC1</i>	CGCTGATTAATTGGTATTTCTCTTCA	
F- <i>vanC2/3</i>	TTCCGCAGTGCTCCTACAAA	82
R- <i>vanC2/3</i>	GCACCGACAGTCAAAGAGTCG	

F = Vorwärtsprimer (forward primer), R = Rückwärtsprimer (reverse primer)

### 3.4 Methode MRS und VRE

#### 3.4.1 Probennahme in den Betrieben

Die Probennahme in den Betrieben erfolgte in enger Kooperation mit dem Geflügelgesundheitsdienst Stuttgart.

Die Untersuchungen auf MRSA wurden gemäß den Angaben des BfR, die im Rahmen des Zoonose-Monitorings bei Schweinen erstellt worden sind, durchgeführt (BfR, 2009). Die rechtlichen Grundlagen hierfür sind die Richtlinie (EG, 2003) (Anon, 2003), die Entscheidung (EG, 2008) (Anon, 2008a) und die AVV Zoonosen Lebensmittelkette vom 11.6.2008 (Anon, 2008b).

Die Untersuchungen auf VRE wurden in Anlehnung an die Methode von Ellerbroek et al. (2004) durchgeführt.

Die Tupferentnahme erfolgte mit sterilen Gazetupfern unter Tragen von sterilen Handschuhen. Eine Person fixierte die Puten fachgerecht, eine weitere Person strich die Trachea und die Kloake der Puten mit jeweils sterilen Tupfern ab.

Die Entnahme der zweimal fünf (fünf für den MRSA- und fünf für den VRE-Nachweis) Staubtupferproben (fünf Entnahmeorte im Stall) erfolgte in jedem Stall jeweils auf einer Fläche von ca. 500 cm<sup>2</sup> durch Abstreichen dieser Fläche mit den Tupfern. Die fünf Orte der Tupferentnahme wurden in jedem Betrieb einheitlich gewählt. Diese waren zum einen eine Fläche eines Fenstersims der rechten und zum anderen der linken Seite des Stalles sowie

die Oberfläche eines Futtertroges, die Abtrennung zur Separatenbucht für kranke Tiere und die Oberfläche eines Futterzuteilungssystems.

Die Proben wurden noch am selben Tag gekühlt ins Labor transportiert und bearbeitet.

### **3.4.2 Probennahme bei den Personen**

Die Durchführung der Probenahme übernahmen die Personen jeweils selbständig mit Hilfe zugesendeter Tupferproben und einer Anleitung. Jede Person entnahm sich zwei Abstriche der Schleimhäute beider Nasenvorhöfe.

## **3.5 Methode MRS**

### **3.5.1 Vorversuche zur Entwicklung der Real-Time PCR-Tests**

Ziel der Vorversuche war es, PCR-Methoden auf der Basis der Real-Time PCR-Technik zu entwickeln, um Isolate mit möglichst geringem Aufwand rasch und auch in großer Anzahl testen zu können. Hierzu wurden als erster Schritt Gensequenzen des *mecA*-Resistenzgens von MRSA der NCBI-Datenbank entnommen. Anschließend wurden Abschnitte der DNA-Sequenzen der ausgewählten Gene auf Übereinstimmungen verglichen (DNA-Alignments), um Bereiche einheitlicher DNA-Sequenzen für das Design von PCR-Primern zu ermitteln. Die verschiedenen *mecA*-Resistenzgene, die die Grundlage des Alignments darstellen, sind in der Tabelle 7 dargestellt. Das Primer-Design wurde unter Anwendung des Programms Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) vorgenommen. Erste Tests zur Spezifität der entworfenen Primer erfolgten mittels sog. BLAST-Abfragen der NCBI-Datenbank. Mit dem Ziel, möglichst hohe Spezifitätswerte der PCR-Tests zu erreichen, wurden jeweils Primerpaare für die einzelnen Resistenzgene ausgewählt, deren Nukleotid-Sequenzen eine möglichst große Abweichung zu Gensequenzen aufweisen, die nicht detektiert werden sollen. Die entsprechenden Primerpaare wurden von der Firma Eurogentec im Auftrag synthetisiert.

Die erste Funktionsprüfung der Real-Time PCR erfolgte mit 20 *mecA*-Gen positiven und 20 *mecA*-Gen negativen *Staphylococcus aureus* Feldisolate des Labors Lebensmittelmikrobiologie des CVUA Stuttgart, die im Anhang in Tabelle 50 aufgeführt sind. Diese insgesamt 40 Feldstämme waren zuvor unter Verwendung des Light Cycler-Systems (Roche) (Grisold et al., 2002) überprüft worden.

Anschließend erfolgte die Sequenzierung des *mecA*-Gen positiven *Staphylococcus aureus*-Stamms DSM 11729. Mit Hilfe der Sequenzierung sollte gezeigt werden, dass die Primer komplementär zur Sequenz des *mecA*-Gens dieses Referenzstammes sind.

Dazu wurde eine klassische PCR entworfen, deren Primer einige Basenpaare entfernt von den Primern der Real-Time PCR liegen. Die Primer und die Reagenzien dieser PCR sind in Tabelle 8 und 9 aufgelistet. Um die optimale Temperatur der Primer-Anlagerung (Annealing-Temperatur) zu bestimmen, wurde im Thermoblock des PCR-Cyclers ein Temperaturgradient von 45°C bis 65,6°C aufgebaut, der in Tabelle 10 dargestellt ist. Das Temperaturprofil der klassischen PCR ist in Tabelle 11 dargestellt. Nach Ablauf der PCR wurde eine Bande entsprechend dem zu erwartenden Amplifikat aus dem Agarosegel herausgetrennt und die DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt. Lagen zwei Banden pro Ansatz vor, wurde das GelExtraktions Kit zur Aufreinigung der Bande verwendet, anschließend wurde die Bande ausgewählt, deren Größe des zu erwartenden Amplifikats entsprach. Die aufgereinigten Amplifikate wurden anschließend in einem Mikro-Schraubröhrchen zur DNA-Sequenzierung an die Firma Microsynth AG geschickt. Die schematische Darstellung der Validierung der Real-Time PCR zeigt das Diagramm 1 auf.

Diagramm 1: Schematische Darstellung der Validierung der Real-Time PCR zum Nachweis des *mecA*-Resistenzgens von MRSA

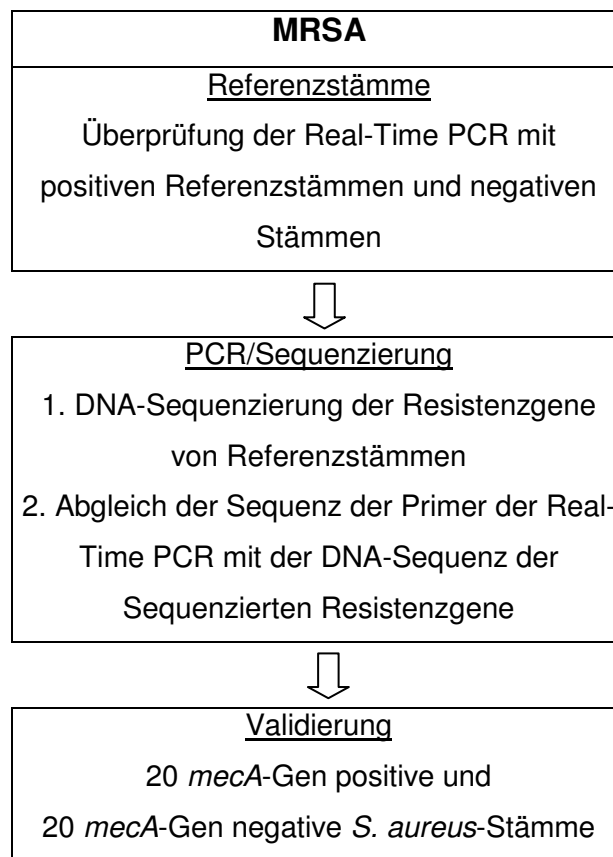


Tabelle 7: Übersicht über die DNA-Sequenzen des *mecA*-Gens von MRSA aus der NCBI-Datenbank, die die Grundlage für das Alignments bilden

Resistenzgen	Accession No	Alignment
<i>mecA</i>	EU 790489	<i>mecA</i>
<i>mecA</i>	AB 221123	
<i>mecA</i>	AB 221124	
<i>mecA</i>	AB 221120	
<i>mecA</i>	EO 9771	

Tabelle 8: Sequenzen der Primer, die für die Durchführung der klassische PCR zum Zwecke der Gewinnung von Amplifikaten für die DNA-Sequenzierung des *mecA*-Gens von MRSA verwendet wurden

Primer	Nukleotidsequenz (5´-3´)
F- <i>mecA</i> -Sequenz	CAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAA
R- <i>mecA</i> -Sequenz	TCGAGTGCTACTCTAGCAAAGAAAAT

F = Vorwärtsprimer (forward primer), R = Rückwärtsprimer (reverse primer)

Tabelle 9: Übersicht über die Reagenzien, die für die Durchführung der klassischen PCR zum Zwecke der Gewinnung von Amplifikaten für die DNA-Sequenzierung des *mecA*-Gens von MRSA-Keimen verwendet worden sind

Reagenzien	Menge (µl) pro Probe und Ansatz
Mastermix	20,0
F-Primer ( 0,1µM*)	1,0
R-Primer ( 0,1µM*)	1,0
Wasser	23,0
DNA (Probe)	5,0
Reaktionsansatz pro Reaktionsgefäß ohne Probe (µl)	45,0
Reaktionsansatz pro Reaktionsgefäß komplett (µl)	50,0

\* Endkonzentration im kompletten Reaktionsansatz

Tabelle 10: Übersicht über den Temperaturgradient, der für die Durchführung der klassischen PCR zum Zwecke der Gewinnung von Amplifikaten für die DNA-Sequenzierung des *mecA*-Gens von MRSA-Keimen angewendet wurde

Spalte	Temperatur
1	45,0 °C
2	45,3 °C
3	46,4 °C
4	48,2 °C
5	50,4 °C
6	53,0 °C
7	55,8 °C
8	58,5 °C
9	61,0 °C
10	63,1 °C
11	64,7 °C
12	65,6 °C

Tabelle 11: Übersicht über das Temperaturprofil, das für die Durchführung der klassischen PCR zum Zwecke der Gewinnung von Amplifikaten für die DNA-Sequenzierung des *mecA*-Gens von MRSA-Keimen angewendet wurde

Schritt	Dauer	Temperatur	
Pre-Denaturierung	2 min	94 °C	
Anlagerung	30 sec	Gradient von 45 °C bis 65,6 °C } 35 Zyklen	
Synthese	1 min		72 °C
Denaturierung	30 sec		94 °C
Abschließende Synthese	5 min	72 °C	



## 3.5.2 Mikrobiologische Untersuchungen von Feldproben

### 3.5.2.1 Isolierung

Als erster Schritt der Gewinnung von MRSA Feldisolaten erfolgte die Voranreicherung. Jede Tracheal-, Kloaken- und Humantupferprobe wurde hierfür in 10ml Müller-Hinton-Bouillon mit Zusatz von 6,5% NaCl gegeben und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Die fünf Staubtupferproben wurden gemeinsam als Pool in 100ml Müller-Hinton-Bouillon mit Zusatz von 6,5% NaCl gegeben und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Anschließend erfolgte eine Anreicherung. Dazu wurde jeweils 1ml der bebrüteten Müller-Hinton-Bouillon zu jeweils 9ml Trypton-Soja-Bouillon mit Zusatz der Antibiotika Cefoxitin und Aztreonam gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgte der Ausstrich auf die MRSA-Selektivnährböden, wobei 20µl der inkubierten Anreicherungsbouillon im Drei-Ösen-Ausstrich auf den Selektivplatten ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet wurden.

Die Auswertung der Selektivplatten wurde nach den Angaben der Herstellerfirma durchgeführt. Pro Probe wurden bis zu drei als MRSA verdächtige Kolonien auf Blutplatten überimpft und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Dabei galten die rot-violeten Kolonien als MRSA verdächtig.

Zusätzlich wurden pro Probe, wenn vorhanden, bis zu drei weiße Kolonien auf Blutplatten überimpft und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Diese weißen Kolonien erwiesen sich überwiegend als Staphylokokken ausgenommen *S.aureus*, die das *mecA*-Resistenzgen trugen (MRSASA = Methicillin-resistente Staphylokokken ausgenommen *S. aureus*).

### 3.5.2.2 Charakterisierung des *mecA*-Resistenzgens mittels Real-Time PCR

Der molekularbiologische Nachweis von Resistenzgenen erfolgte mit Hilfe der Real-Time PCR unter Verwendung von SYBR Green. Diese PCR-Methode ermöglicht einen Nachweis von Amplifikaten durch Einlagerungen (Interkalation) des Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green) in DNA-Doppelstränge, die im Verlauf der PCR synthetisiert werden.

Die PCR gliedert sich dabei in drei Schritte.

1. Schritt Denaturierung: Trennung von DNA-Doppelsträngen in DNA-Einzelstränge durch Hitze.
2. Schritt Annealing: Anlagerung der Primer an Nukleinsäure-Einzelstränge.
3. Schritt Elongation: Mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen werden nach der Anlagerung der Primer die chemischen Bindungen von Nukleotiden zu einem DNA-Doppelstrang vervollständigt, der der Template-DNA komplementär ist.

Die in der Elongationsphase entstehenden DNA-Doppelstränge (Amplifikate) sind in der Lage, den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green einzulagern. Dies führt zur Emission von Fluoreszenzlicht nach Anregung durch UV-Licht bestimmter Wellenlänge. Die Emission von Fluoreszenzlicht wird während des PCR-Laufs kontinuierlich gemessen. Zusätzlich wird eine Schmelzkurve im Anschluss an die PCR erstellt. Für das Erstellen einer Schmelzkurve wird die Temperatur beginnend bei 63,1-64 °C bis 91,5-92 °C in Temperaturschritten von 0,3-0,4 °C kontinuierlich erhöht (die Bereiche werden automatisch vom Programm festgelegt). Mit ansteigender Temperatur trennen sich die DNA-Doppelstränge zunehmend in DNA Einzelstränge auf. Trägt man in einem Fluoreszenz/Temperatur-Diagramm die Änderung der Fluoreszenzsignals pro Zeiteinheit ( $-\Delta F/\Delta T$ ) auf, erhält man eine Kurve deren Maximalwert die Schmelztemperatur ( $T_M$ ) des Amplifikates angibt. Die Schmelztemperaturen der Positivkontrollen und die der Proben können mit Hilfe grafischer Darstellungen auf deren Übereinstimmung geprüft werden.

Zur Gewinnung von DNA aus Bakterien wurden die als MRS positiv identifizierten Kolonien von einer Blutplatte mit einer sterilen Öse abgenommen und in 200 µl steriles Wasser suspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 15min bei 99 °C erhitzt. Nach der Zentrifugation bei 8.000xg konnte der klare Überstand für den Einsatz in der PCR abpipettiert werden.

Anschließend wurde der PCR-Reaktionsansatz entsprechenden der Angaben in Tabelle 12 hergestellt. Nach dem Pipettieren in die PCR-Mikrotiterplatte wurde diese mit einer

speziellen optischen Folie versiegelt, geschüttelt und bei 2.000U/min für 2 min zentrifugiert. Das Temperaturprofil der Real-Time PCR ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 12: Übersicht über die für die MRSA Real-Time PCR verwendeten Reagenzien

Reagenzien	Menge (µl) pro Reaktionsansatz
Master Mix	5,5
Primer F (0,1µM*)	0,4
Primer R (0,1µM*)	0,4
Destilliertes, steriles Wasser	1,5
Reaktionsansatz pro Reaktionsgefäß ohne Probe (µl)	7,8
DNA (Probe)	2,2
Reaktionsansatz pro Reaktionsgefäß komplett (µl)	10,0

\* Endkonzentration im kompletten Reaktionsansatz

Tabelle 13: Übersicht über das Temperaturprofil der MRSA Real-Time PCR

Schritt	Dauer	Temperatur
Pre-Denaturierung	10 min	95 °C
Anlagerung und Synthese	60 sec	60 °C } 30 Zyklen 95 °C
Denaturierung	15 sec	
Schmelzkurve	20 sec	63,1-64 °C bis 91,5-92 °C

### 3.5.2.3 Identifizierung mittels FT-IR

Die anschließende Identifizierung der Isolate erfolgte mit Hilfe von FT-IR-Spektralanalysen (Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie) (Naumann et al., 1990; Helm et al., 1991; Kirschner, 2004; Horlacher und Rau, 2006). Die IR-Spektralanalyse bietet die Möglichkeit der Identifizierung von Molekülen anhand charakteristischer IR-Spektren. Bestimmte funktionelle Gruppen organischer Substanzen zeigen charakteristische Absorptionen im Infrarotlicht (IR). Da Mikroorganismen komplexe Gemische organischer Substanzen darstellen, können mittels getrockneter Filme mikrobieller Reinkulturen, die unter einheitlichen kulturellen Bedingungen angezüchtet worden sind, reproduzierbare IR-Spektren gewonnen werden. Durch vergleichende Analysen von IR-Spektren unbekannter Spezies mit den in einer

Datenbank hinterlegten Spektren bekannter Spezies sind Gattungs- und Spezies-Bestimmungen möglich.

Von den mittels Selektivitätsplatten und Real-Time PCR als *mecA*-positiv identifizierten Kolonien wurden Reinkulturen auf Blutplatten überimpft und bei 37°C für 24 ± 0,5 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die gewachsenen Keime für die IR-Messung vorbereitet. Hierzu wurden mit einer Öse Bakterien vorsichtig unter Vermeidung von Agarbestandteilen entnommen und je Isolat in 80µl Aqua dest. in einem Reaktionsgefäß unter Verwendung einer vibrierenden Öse suspensiert. Von der nun vorliegenden trüben Bakteriensuspension wurden 35µl auf eine ringförmige Position des ZnSe-Probenrades pipettiert. Auf dem ZnSe-Probenrad können bis zu 15 Stämme und zusätzlich eine Messposition, die als Nullkontrolle dient, aufgetragen werden.

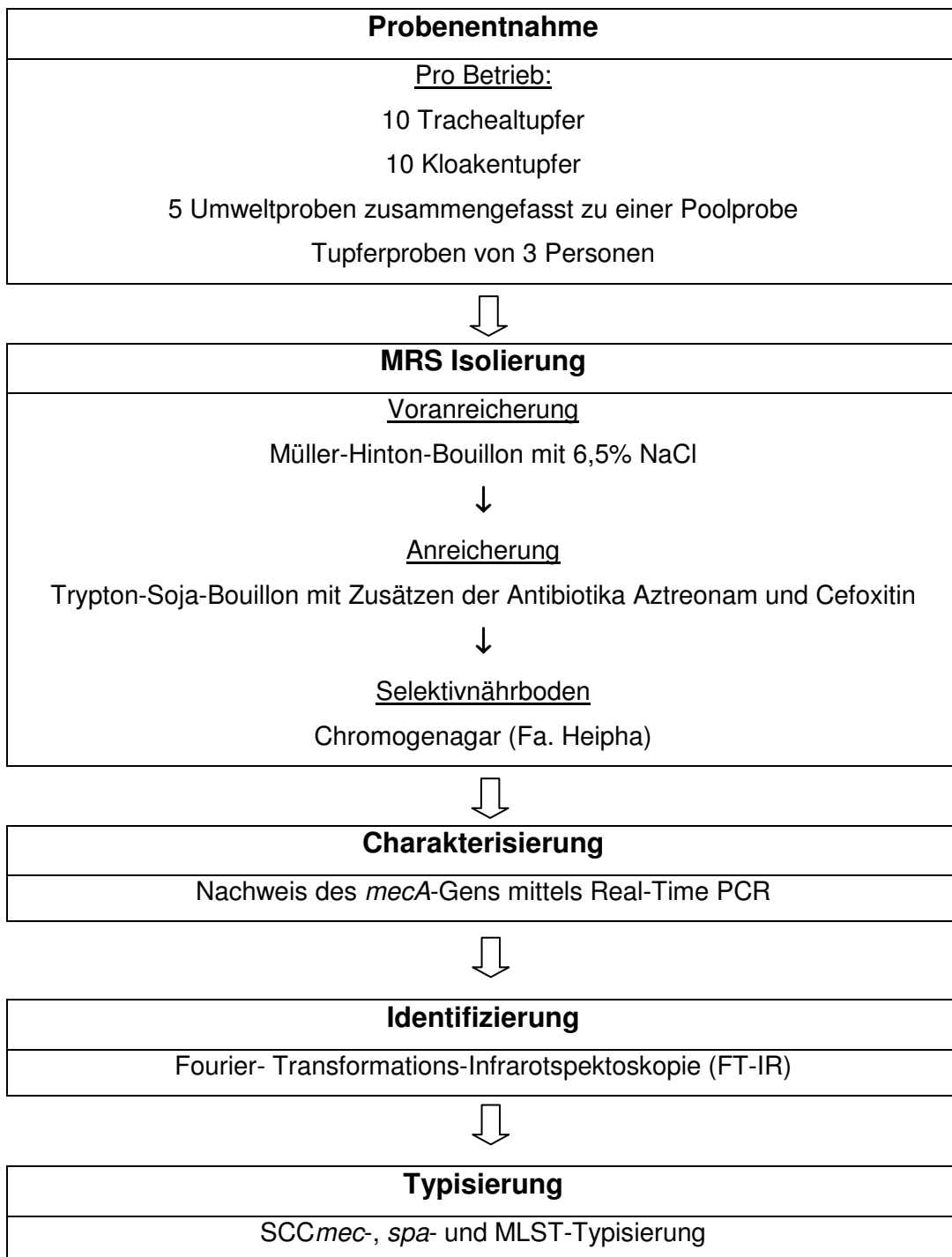
Anschließend wurden die aufgetragenen Bakteriensuspensionen auf dem ZnSe-Probenrad in einem Exsikkator bei 0,9 bar für 25-30min getrocknet. Nach dem Trocknen erfolgten die Messungen. Das FT-IR wird durch die OPUS Software 4.2 gesteuert. Jede Messung besteht aus mehreren Scans, von denen die OPUS Software einen Mittelwert bildet. Die aufgenommenen IR-Spektren wurden anschließend mittels des Programms NeuroDeveloper 2.5b zum Aufbau eines hierarchischen Klassifizierungsschemas verarbeitet.

### 3.5.2.4 Molekulare Typisierung

Die in der Real-Time PCR und FT-IR bestätigten Isolate wurden anschließend im Nationalen Referenzlabor für Koagulase positive Staphylokokken incl. *S. aureus* (NRL-Staph) im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) molekularbiologisch untersucht. Zunächst wurde die DNA der Isolate mit dem RTP bacteria DNA Mini Kit (Invitex, Berlin, Deutschland) isoliert und die verdächtigen Isolate mittels Multiplex-PCR bestätigt (Poulsen et al., 2003). Anschließend erfolgte die *SCCmec*- und *spa*-Typisierung (Zhang et al., 2005; Shopsin et al., 1999). Bei mindestens einem Isolat pro identifiziertem *spa*-Typ wurde zudem der MLST-Typ bestimmt (Enright et al., 2000). Die Sequenzierung der PCR-Produkte übernahm Qiagen (Hilden, Deutschland). Zur Bezeichnung von *spa*- und Sequenz-Typ (ST) wurde die Software Ridom Staphtype (Ridom GmbH, Würzburg, Deutschland) beziehungsweise die *S. aureus* MLST database (<http://www.saureus.mlst.net>) genutzt. Als Kontrollstämme wurden umfassend charakterisierte Feldstämme aus der Stammkollektion des NRL-Staph (*spa*-, *SCCmec*-, MLST Typisierung) sowie die Referenzstämme DSM 1104 bzw. DSM 13661 (Speziesidentifizierung) eingesetzt.

Die gesamten Schritte der Gewinnung, Identifizierung, Charakterisierung und Typisierung von MRSA-Keimen sind in Diagramm 2 zusammenfassend dargestellt.

Diagramm 2: Schematische Darstellung der Entnahme von Proben sowie der Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von MRSA Keimen



## 3.6 Methode VRE

### 3.6.1 Vorversuche zur Entwicklung der Real-Time PCR-Tests

Ziel dieser Vorversuche war es, eine Real-Time PCR-Technik zu entwickeln, um Enterokokken-Isolate mit möglichst geringem Aufwand, rasch und auch in entsprechend großer Anzahl auf Resistenzgene testen zu können. Als erster Schritt wurden Gensequenzen der NCBI-Datenbank des *vanA*-, *vanB1/2*-, *vanC1*- und *vanC2/3*-Resistenzgens von VRE entnommen. Anschließend wurden Abschnitte der DNA-Sequenzen selektierter Gene auf Übereinstimmungen verglichen (DNA-Alignments), um Bereiche einheitlicher DNA-Sequenzen für das Design von PCR-Primern zu ermitteln. Die verschiedenen *van*-Resistenzgene, die die Grundlage des Alignments darstellen, sind in Tabelle 14 dargestellt. Das Primer-Design wurde unter Anwendung des Programms Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) vorgenommen. Erste Tests zur Spezifität der entworfenen Primer erfolgten mittels sog. BLAST-Abfragen der NCBI-Datenbank. Zur Erzielung möglichst hoher Spezifitätswerte der PCR-Tests wurden jeweils Primerpaare für die einzelnen Resistenzgene ausgewählt, deren Nukleotid-Sequenzen eine möglichst große Abweichung zu Gensequenzen aufweisen, die nicht detektiert werden sollen. Die entsprechenden Primerpaare wurden von der Firma Eurogentec im Auftrag synthetisiert.

Die erste Überprüfung der Real-Time PCR erfolgte mit den in der Tabelle 5 aufgeführten Referenzstämmen.

Anschließend erfolgte die Sequenzierung des *vanA*-Gens des *E. faecium*-Stammes BM 4147, des *vanB*-Gen (*vanB1*) positiven *E. faecium*-Stammes UAA 522, des *vanC1*-Gen positiven *E. faecium*-Stammes BM 4174 und des *vanC2/3*-Gen positiven *E. casseliflavus*-Stammes ATCC 25788. Durch die Sequenzierung sollte der Nachweis erbracht werden, dass die Primer der Real-Time PCR im Bereich der *van*-Gene der Referenzstämme liegen.

Dazu wurde eine klassische PCR entworfen, deren Primer einige Basenpaare entfernt von den Primern der Real-Time PCR liegen. Die Primer und der Mastermix dieser PCR sind in Tabelle 15 und 16 aufgeführt. Um die optimale Temperatur der Primer-Anlagerung zu bestimmen, wurde ein Temperaturgradient von 45°C bis 65,6°C aufgebaut der in Tabelle 17 dargestellt ist. Das Temperaturprofil der klassischen PCR ist in Tabelle 18 dargestellt. Nach Ablauf der PCR wurde eine Bande entsprechend dem zu erwartenden Amplifikat ausgewählt und mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt. Lagen zwei Banden pro Ansatz vor, wurde das GelExtraktions Kit verwendet und ebenfalls nur eine Bande entsprechend der zu erwartenden Größe des Amplifikats aufgereinigt. Die aufgereinigten Amplifikate wurden anschließend in Mikro-Schraubröhrchen zur DNA-Sequenzieren an die Firma Microsynth AG

geschickt. Die einzelnen Schritte der Validierung der Real-Time PCR sind in Diagramm 3 dargestellt.

Tabelle 14: Übersicht über die DNA-Sequenzen der *van*-Resistenzgene von VRE, die der NCBI-Datenbank entnommen wurde und als Grundlage für die Alignments dienten

<b>Resistenzgen</b>	<b>Accession No</b>	<b>Alignment</b>
<i>vanA</i>	EF206284	<i>VanA</i>
<i>vanA</i>	EF206285	
<i>vanA</i>	X56895	
<i>vanA</i>	EF206286	
<i>vanB (vanB1)</i>	U00456	<i>VanB1/2</i>
<i>vanB (vanB1)</i>	ENEVANB	
<i>vanB2</i>	AY145441	
<i>vanB2</i>	ENEVANB2A	
<i>vanC1</i>	EU151772	<i>vanC1</i>
<i>vanC1</i>	EU151771	
<i>vanC1</i>	EU151769	
<i>vanC1</i>	EU151770	
<i>vanC1</i>	EU151768	
<i>vanC2</i>	ECU94523	<i>vanC2/3</i>
<i>vanC2</i>	ECU94525	
<i>vanC2/3</i>	EU151762	
<i>vanC2/3</i>	EU151764	
<i>vanC3</i>	AY033764	

Tabelle 15: Sequenzen der Primer, die für die Durchführung der klassische PCR zum Zwecke der Gewinnung von Amplifikaten der *van*-Gene von VRE mit dem Ziel der DNA-Sequenzierung verwendet wurden

Target-Gen	Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')
<i>vanA</i>	F- <i>vanA</i> -Sequenz	CTGCAATAGAGATAGCCGCTAACA
	R- <i>vanA</i> -Sequenz	TGTATCCGTCCTCGCTCCTC
<i>VanB1/2/3</i>	F- <i>vanB1/2/3</i> -Sequenz	GCCTACATTCTTACAAAAATGCG
	R- <i>vanB1/2/3</i> -Sequenz	GAGCCTTTTTCCGGCTCG
<i>vanC1</i>	F- <i>vanC1</i> -Sequenz	GGGAATCGCTAGTGCTCCC
	R- <i>vanC1</i> -Sequenz	TGTGCCTGCTCCTTGATCTG
<i>vanC2/3</i>	F- <i>vanC2/3</i> -Sequenz	CCAGCAAGAACAATCGAAGC
	R- <i>vanC2/3</i> -Sequenz	TGCGAGCAAGACCTTTAAGTCC

F = Vorwärtsprimer (forward primer), R = Rückwärtsprimer (reverse primer)

Tabelle 16: Übersicht über die Reagenzien, die für die Durchführung der klassischen PCR zum Zwecke der Gewinnung von Amplifikaten für die DNA-Sequenzierung der *van*-Gene von VRE-Keimen verwendet wurden

Reagenzien	Menge (µl) pro Probe und Ansatz
Mastermix	20,0
F-Primer ( 0,1µM*)	1,0
R-Primer ( 0,1µM*)	1,0
Wasser	23,0
DNA (Probe)	5,0
Reaktionsansatz pro Reaktionsgefäß ohne Probe (µl)	45,0
Reaktionsansatz pro Reaktionsgefäß komplett (µl)	50,0

\* Endkonzentration im kompletten Reaktionsansatz



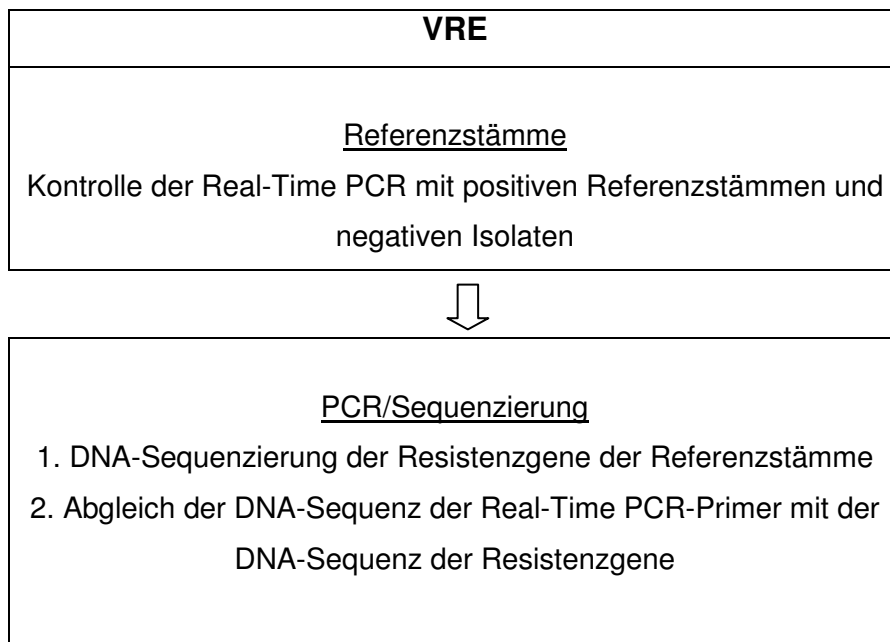
Tabelle 17: Übersicht über den Temperaturgradient, der für die Durchführung der klassischen PCR zum Zwecke der Gewinnung von Amplifikaten für die DNA-Sequenzierung der *van*-Gene von VRE-Keimen angewendet wurden

Spalte	Temperatur
1	45,0 °C
2	45,3 °C
3	46,4 °C
4	48,2 °C
5	50,4 °C
6	53,0 °C
7	55,8 °C
8	58,5 °C
9	61,0 °C
10	63,1 °C
11	64,7 °C
12	65,6 °C

Tabelle 18: Übersicht über das Temperaturprofil, das für die Durchführung der klassischen PCR zum Zwecke der Gewinnung von Amplifikaten für die DNA-Sequenzierung der *van*-Gene von VRE-Keimen angewendet wurde

Schritt	Dauer	Temperatur	
Pre-Denaturierung	2 min	94 °C	
Anlagerung	30 sec	Gradient von 45 °C bis 65,6 °C } 35 Zyklen	
Synthese	1 min		72 °C
Denaturierung	30 sec		94 °C
Abschließende Synthese	5 min	72 °C	

Diagramm 3: Validierung der Real-Time PCR zum Nachweis von Resistenzgenen bei VRE-Keimen



### 3.6.2 Mikrobiologische Untersuchungen von Feldproben

#### 3.6.2.1 Isolierung

Als erster Schritt der Isolierung von VRE-Keimen diene deren Anreicherung. Jede Kloakentupferprobe sowie die Tupferproben von Personen wurden in 10ml Chromocult Enterokokken-Bouillon gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die fünf Staubtupferproben wurden als Poolproben in 100ml Chromocult Enterokokken-Bouillon für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Am zweiten Tag erfolgte der Ausstrich auf VRE-Selektivnährböden (Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar mit Vancomycin-Zusatz nach Angaben von Ellerbroek et al., 2004). Hierfür wurden 20µl der inkubierten Anreicherungsbouillon im Drei-Ösen-Ausstrich auf den Selektivplatten ausgestrichen und für insgesamt 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

Die Auswertung der Selektivplatten erfolgte am dritten und abschließend am vierten Tag, jeweils nach 24 Stunden und 48 Stunden Bebrütung. Die Kriterien der Auswertungen wurden den Angaben der Herstellerfirmen entnommen. Graue Kolonien mit schwarzem Präzipitationshof wurden als VRE verdächtige Keime angesprochen. Pro Probe wurden, wenn vorhanden, bis zu drei solcher Kolonien auf Blutplatten überimpft und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

### **3.6.2.2 Identifizierung mittels biochemischen Eigenschaften**

Die Identifizierung von Enterokokken erfolgte in Anlehnung an Ruoff (2003). Die Identifizierung umfasst mehrere Schritte, wobei eine Auswertung nach den in der Tabelle 19 angegebenen Kriterien vorgenommen wurde. Die mittels Selektivagar vorläufig als Enterokokken identifizierten Keime wurden auf einen CATC- und einem Blut-Glucose-Äsculin-Galle-Agar ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Um das Wachstum von Enterokokken bei 6,5% NaCl zu testen, wurden die Kolonien in eine CASO-Bouillon mit Zusatz von 6,5% NaCl und als Kontrolle in eine CASO-Bouillon ohne Zusatz von 6,5% NaCl überimpft und bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach 24 Stunden, wobei eine Trübung der Bouillon mit Bodensatzbildung als Nachweis eines Wachstums galt.

Um das Wachstum von Enterokokken bei 45°C zu testen, wurden die Kolonien auf eine Blutplatte überimpft und für 24 Stunden bei 45°C bebrütet.

Die Beweglichkeit der Keime wurde in einem Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) -haltigen SIM-Medium überprüft. Dazu wurde das SIM-Medium beimpft und für fünf Tage bei 37°C inkubiert. Das Ablesen des Mediums erfolgte täglich. Bewegliche Keime zeigen ein gläserbürstenartiges Wachstum, die Prüfung der Medien wird durch die Rotfärbung mittels TTC erleichtert.

Die Pyrrolidonyl-Peptidase Aktivität von Enterokokken wurde mit dem O.B.I.S. PYR-Test und die Leucin-Amino-peptidase-Aktivität mit dem LAP-Test Kit nach den Herstellerangaben getestet.

Tabelle 19: Identifizierung von Enterokokken und Streptokokken (nach Ruoff, 2003; ergänzt durch CATC-Agar, Heipha)

<b>Bakterienspezies</b>	<b>CATC-Agar</b>	<b>Blut-Glucose- Äsculin-Galle- Agar</b>	<b>Wachstum bei 6,5 % NaCl</b>	<b>Wachstum bei 45°C</b>	<b>PYR- Test</b>	<b>LAP- Test</b>	<b>Beweglichkeit</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	rote Kolonien	positiv	positiv	Positiv	positiv	positiv	negativ
<i>Enterococcus faecium</i>	pink, roséfarbene Kolonien	positiv	positiv	Positiv	positiv	positiv	negativ
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	pink, roséfarbene Kolonien	positiv	positiv	Positiv	positiv	positiv	positiv
<i>Enterococcus gallinarum</i>	pink, roséfarbene Kolonien	positiv	positiv	Positiv	positiv	positiv	positiv
<i>Streptococcus equi</i> <i>ssp. zooepidermicus</i>	kein Wachstum oder kleine farblose Kolonien	negativ	negativ	Negativ	negativ	positiv	negativ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	kein Wachstum oder kleine farblose Kolonien	negativ	negativ	Negativ	negativ	positiv	negativ
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	kein Wachstum oder kleine farblose Kolonien	negativ	negativ	Negativ	negativ	negativ	negativ

### 3.6.2.3 Charakterisierung der *van*-Resistenzgene mittels Real-Time PCR

Der anschließende molekularbiologische Nachweis von Resistenzgenen erfolgte mittels Real-Time PCR unter Verwendung von SYBR Green.

Zur Gewinnung von DNA aus Enterokokken wurden bis zu drei der Kolonien von einer Blutplatte mit einer sterilen Öse abgenommen und in 200µl sterilem Wasser suspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 15min bei 99°C erhitzt. Nach der Zentrifugation bei 8.000xg konnte der klare Überstand für die PCR verwendet werden. Der Reaktionsansatz der PCR wurde wie in Tabelle 20 angegeben pipettiert.

Tabelle 20: Übersicht über die verwendeten Reagenzien für die VRE Real-Time PCR

Reagenzien	Menge (µl) pro Reaktionsansatz
Master Mix	5,5
Primer F (0,1µM*)	0,4
Primer R (0,1µM*)	0,4
Destilliertes, steriles Wasser	1,5
Reaktionsansatz pro Reaktionsgefäß ohne Probe (µl)	7,8
DNA (Probe)	2,2
Reaktionsansatz pro Reaktionsgefäß komplett (µl)	10,0

\* Endkonzentration im kompletten Reaktionsansatz

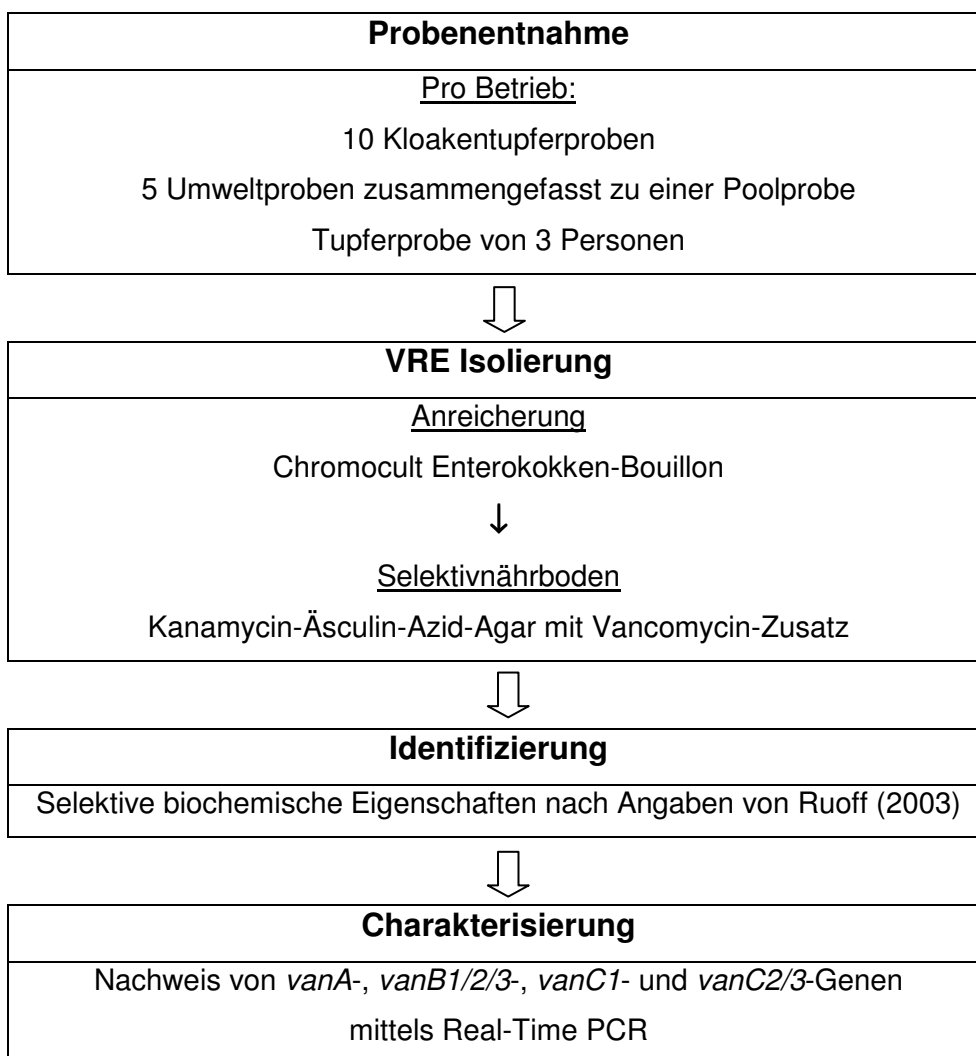
Nach dem Pipettieren des Reaktionsansatzes in die Vertiefungen von PCR-Mikrotiterplatten wurde diese mit einer selbstklebenden optischen Folie versiegelt, geschüttelt und bei 2.000U/min für zwei Minuten zentrifugiert. Die Bedingungen des PCR-Laufs sind in Tabelle 21 übersichtlich dargestellt.

Die gesamten Schritte der Gewinnung, Identifizierung und Charakterisierung von VRE-Keimen sind in Diagramm 4 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 21: Übersicht über das Temperaturprofil der VRE Real-Time PCR

Schritt	Dauer	Temperatur
Pre-Denaturierung	10 min	95 °C
Anlagerung und Synthese	60 sec	60 °C } 30 Zyklen 95 °C
Denaturierung	15 sec	
Schmelzkurve	20 sec	63,1-64 °C bis 91,5-92 °C

Diagramm 4: Entnahme von Proben sowie Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von VRE-Keimen



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse MRS

#### 4.1.1 Ergebnisse der Vorversuche zur Entwicklung der Real-Time PCR-Tests

##### Sequenz-Alignment mit Hilfe von NCBI-Sequenzdaten

Mit Hilfe der NCBI-Datenbank wurden Gensequenzen des *mecA*-Resistenzgens von MRSA ausgewählt. Anschließend wurden diese ausgewählten Abschnitte der Gensequenzen auf Übereinstimmungen verglichen (Nukleotid-Alignments), um Bereiche einheitlicher Nukleotid-Sequenzen für das Design von PCR-Primern zu erhalten. Bei den *mecA*-Resistenzgenen, die als Grundlage des Nukleotid-Alignments verwendet worden sind, handelt es sich um folgende in der NCBI-Datenbank unter den sog. Accession No registrierten Gensequenzen: EU790489, AB221123, AB221124, AB221120 und EO9771. Das Ergebnis übereinstimmender Nukleotid-Sequenzen des Alignments, die als Grundlage für das Primer-Design dienen, sind im Anhang in Diagramm 9 und 10 dargestellt.

##### Primer-Design

Das Primer-Design wurde unter Anwendung des Programms Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) vorgenommen. Erste Tests zur Spezifität der entworfenen Primer erfolgten mittels sog. BLAST-Abfragen der NCBI-Datenbank. Zur Erzielung möglichst hoher Spezifitätswerte der PCR-Tests wurden jeweils Primerpaare für die einzelnen Resistenzgene ausgewählt, deren Nukleotid-Sequenzen eine möglichst große Abweichung zu Gensequenzen aufweisen, die nicht detektiert werden sollen.

##### Abgleich des Alignment mit den Sequenzen der Sequenzierung des Referenzstammes und den Sequenzen der Primer

Mit Hilfe der klassischen PCR wurde ein Teilstück des *mecA*-Gens des MRSA-Stammes DSM 11729 vervielfältigt und von der Firma Microsynth AG sequenziert. Anhand dieses Sequenzierungsergebnisses ist ersichtlich, dass die Sequenz des Alignments komplementär zu der Nukleotid-Sequenz des *mecA*-Gens des sequenzierten MRSA-Stammes DSM 11729 ist. Zudem zeigt die Sequenzierung, dass die Primer der

entwickelten SYBER Green Real-Time PCR zur Detektion des *mecA*-Gens komplementär zur Sequenz des sequenzierten DSM 11729 Stammes sind.

Die Sequenzen des Sequenzierungsergebnis des DSM 11729 Stammes, des Alignments und der Primer der SYBR Green Real-Time PCR sind im Anhang im Diagramm 9 und 10 dargestellt.

#### Ergebnisse der Validierung der Real-Time PCR

Zur Validierung der SYBR Green Real-Time PCR wurden 20 *mecA*-Gen positive und 20 *mecA*-Gen negative *Staphylococcus aureus*-Stämme in der Real-Time PCR getestet. Die Tabelle 50 im Anhang stellt die 40 *Staphylococcus aureus*-Stämme dar.

Alle 20 *mecA*-Gen positiven *Staphylococcus aureus*-Stämme erwiesen sich in der SYBR Green Real-Time PCR als MRSA-positive Stämme. Alle 20 *mecA*-Gen negative Stämme erwiesen sich in der SYBR Green Real-Time PCR als MRSA-negative Stämme.



#### **4.1.2 Ergebnisse der Isolierung**

Die Isolierung der MRS-Keime erfolgte in einem drei stufigen Verfahren bestehend aus Voranreicherung, Anreicherung und Anzucht auf Selektivplatten. Die Auswertung der Selektivplatten wurde nach den Angaben der Herstellerfirma durchgeführt, dabei galten violett-blaue Kolonien mit glattem Rand als MRSA verdächtig und weiße Kolonien mit glattem Rand als MRSASA verdächtig. Insgesamt wurden auf 271 Selektivplatten MRSA verdächtige Keime und auf 60 Selektivplatten MRSASA verdächtige Keime identifiziert.

#### **4.1.3 Ergebnisse der Charakterisierung des *mecA*-Resistenzgenes mittels Real-Time PCR**

Die Auswertung der SYBR Green Real-Time PCR zum Nachweis des *mecA*-Gens erfolgte im Abgleich mit Ergebnissen des MRSA-Referenzstamms DSM 11729. Bakterienkulturen, die in der Real-Time PCR eine mit dem Referenzstamm vergleichbare Amplifikationskurve und vergleichbaren Schmelzkurvenverlauf sowie eine Schmelztemperatur von 73,5°C mit einer Temperaturabweichung von  $\pm 1^\circ\text{C}$  in Anlehnung an Angaben von Sting (2009) aufwiesen, wurden als MRS-Isolat bewertet. Insgesamt wurde bei 317 Stämmen das *mecA*-Gen nachgewiesen. Eine beispielhafte Darstellung der Schmelz- und Amplifikationskurven liefern Diagramm 5 und 6. Angaben über die genaue Verteilung der *mecA*-Positiven Isolate liefern die Tabellen 23 bis 42.

Diagramm 5: Schmelzkurven der Real-Time PCR zum Nachweis des *mecA*-Resistenzgens von dem *mecA* positiven Referenzstamm DSM 11729 (A), einem *mecA* positiven Feldisolat (B) und dem *mecA* negativen Referenzstamm ATCC 25923 (NK). Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale (Derivative) im Verlauf einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung (Temperature (C)), sowie zusätzlich das Schmelzkurvenintervall zwischen 72,5 und 74,5°C

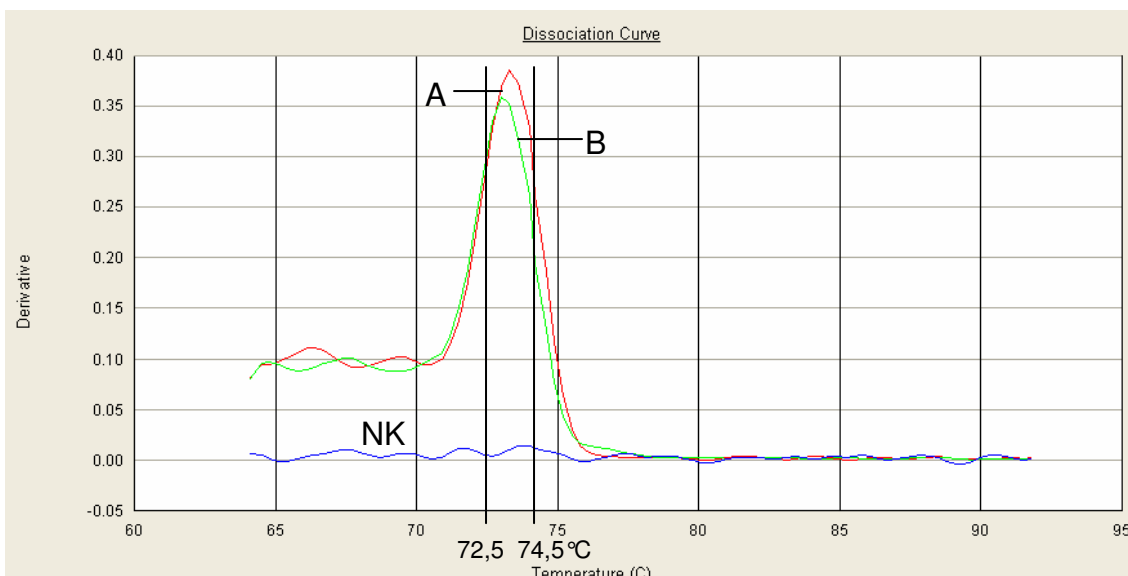
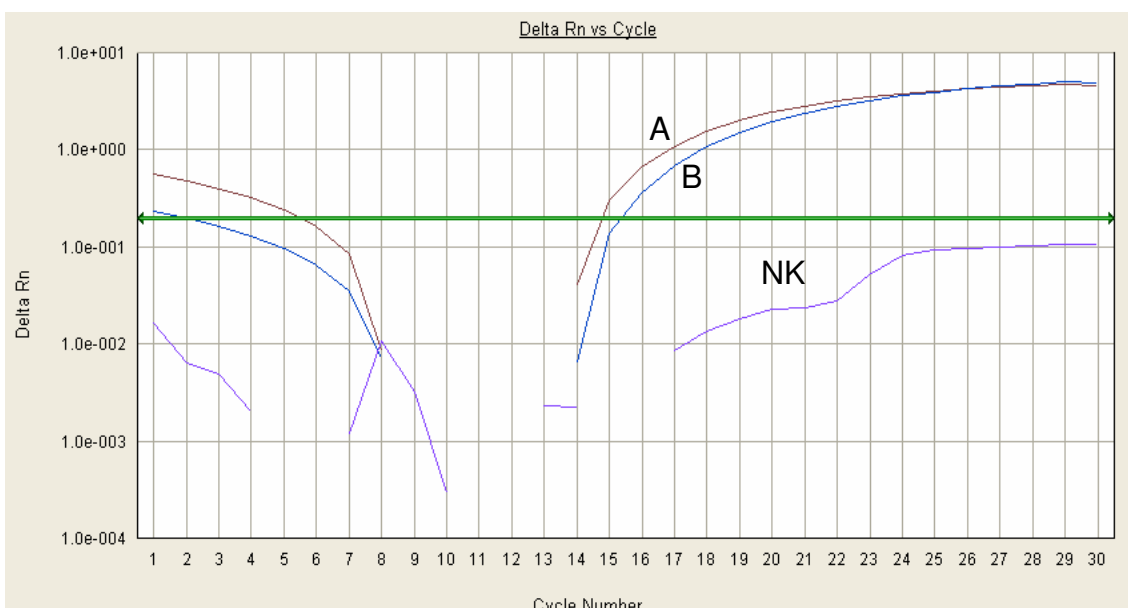


Diagramm 6: Amplifikationskurven der Real-Time PCR zum Nachweis des *mecA*-Resistenzgens von dem *mecA* positiven Referenzstamm DSM 11729 (A), einem *mecA* positiven Feldisolat (B) und dem *mecA* negativen Referenzstamm ATCC 25923 (NK). Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale (Delta Rn) im Verlauf der PCR-Zyklen (Cycler Number)



#### 4.1.4 Ergebnisse der Identifizierung mittels FT-IR

Von den 317 *mecA*-positiven Stämmen wurden 267 als *Staphylococcus aureus* (84,2%), 23 als *Staphylococcus haemolyticus* (7,3%), 15 als *Staphylococcus saprophyticus* (4,7%), sechs als *Staphylococcus epidermidis* (1,9%), vier als *Staphylococcus hyicus* (1,3%) und zwei als *Staphylococcus intermedius* (0,6%) identifiziert. Die Verteilung der unterschiedlichen Staphylokokkenstämme auf die einzelnen Betriebe und unterschiedlichen Probenentnahmelokalisationen ist in Tabelle 22 dargestellt. Die Verteilungen der Staphylokokkenstämme auf die einzelnen Tiere und Personen sind in Tabelle 23 bis 42 aufgeführt.

Tabelle 22: Verteilung der Staphylokokkenstämme auf die beprobten Betriebe, Lokalisationen im Stall und Personen

Betrieb	Trachea	Kloake	Staub	Personen
1	8 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. saprophyticus</i>	5 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. epidermidis</i> 1 <i>S. haemolyticus</i> 1 <i>S. hyicus</i>	1 <i>S. aureus</i>	3 <i>S. aureus</i>
2	10 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. haemolyticus</i>	8 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. haemolyticus</i>	1 <i>S. aureus</i>	2 <i>S. aureus</i>
3	4 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i>	
4		1 <i>S. hyicus</i> 1 <i>S. intermedius</i>		3 <i>S. aureus</i>
5				1 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. haemolyticus</i>
6	10 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. saprophyticus</i> 1 <i>S. haemolyticus</i>	6 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i>	2 <i>S. aureus</i>
7	10 <i>S. aureus</i>	4 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. saprophyticus</i>	1 <i>S. aureus</i>	2 <i>S. aureus</i>
8	9 <i>S. aureus</i> 2 <i>S. saprophyticus</i> 4 <i>S. haemolyticus</i>	5 <i>S. aureus</i> 3 <i>S. haemolyticus</i> 1 <i>S. saprophyticus</i>	1 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. epidermidis</i>

<b>Betrieb</b>	<b>Trachea</b>	<b>Kloake</b>	<b>Staub</b>	<b>Personen</b>
9	9 <i>S. aureus</i> 2 <i>S. saprophyticus</i>	6 <i>S. aureus</i> 3 <i>S. saprophyticus</i>	1 <i>S. aureus</i>	2 <i>S. aureus</i>
10	10 <i>S. aureus</i>	9 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i>	2 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. haemolyticus</i>
11	6 <i>S. aureus</i> 2 <i>S. haemolyticus</i>	1 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. intermedius</i> 2 <i>S. hyicus</i> 2 <i>S. haemolyticus</i>	1 <i>S. aureus</i>	
12	1 <i>S. aureus</i>		1 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. epidermidis</i>
13	10 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. saprophyticus</i>	10 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. saprophyticus</i>	2 <i>S. aureus</i>
14			1 <i>S. aureus</i>	
15	9 <i>S. aureus</i>	8 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i>
16	3 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. saprophyticus</i>	3 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. saprophyticus</i> 3 <i>S. haemolyticus</i>	1 <i>S. aureus</i>	2 <i>S. epidermidis</i>
17	7 <i>S. aureus</i>	5 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. haemolyticus</i>
18	4 <i>S. aureus</i>	8 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i>	
19	9 <i>S. aureus</i>	9 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i>	
20	10 <i>S. aureus</i>	10 <i>S. aureus</i> 2 <i>S. haemolyticus</i>	1 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. epidermidis</i>
<b>Summe</b>	129 <i>S. aureus</i> 8 <i>S. haemolyticus</i> 8 <i>S. saprophyticus</i>	98 <i>S. aureus</i> 12 <i>S. haemolyticus</i> 6 <i>S. saprophyticus</i> 4 <i>S. hyicus</i> 2 <i>S. intermedius</i> 1 <i>S. epidermidis</i>	18 <i>S. aureus</i> 1 <i>S. saprophyticus</i>	22 <i>S. aureus</i> 3 <i>S. haemolyticus</i> 5 <i>S. epidermidis</i>

## 4.1.5 Ergebnisse der Betriebe

### MRSA-Isolate

Von den insgesamt 20 untersuchten Putenmastbetrieben konnten in 18 Betrieben (90%) MRSA-Keime nachgewiesen werden. Hierbei galt ein Betrieb als MRSA-positiv, wenn mindestens eine von einer Pute entnommene Tupferprobe und/oder sich die Staubtupferprobe als MRSA-positiv erwiesen hat. Bei allen 18 positiven Betrieben ergab auch stets die Staubtupferprobe ein MRSA-positives Ergebnis. Von den 18 positiven Betrieben hatten acht Betriebe Hähne und zehn Betriebe Hennen eingestallt.

In elf Betrieben traten MRSASA zusätzlich zu den MRSA auf, in einem Betrieb handelte es sich um MRSASA-Keime, die sowohl in der Staubtupfer- als auch der Tracheltupferprobe einer Pute zu finden waren. In den anderen zehn Betrieben traten MRSASA jeweils nur bei den Tieren auf. In einem Betrieb waren weder MRSA- noch MRSASA-Keime in den Puten- und Staubtupferproben nachweisbar, dafür aber bei den beprobten Personen.

Von den insgesamt 200 beprobten Puten waren 143 Tiere MRSA-positiv (71,5%) und 57 Tiere negativ (28,5%). Von diesen 143 Tieren wiesen 84 Tiere sowohl in der Trachealtupferprobe als auch in der Kloakentupferprobe (58,7%), 45 Tiere nur in der Tracheltupferprobe (31,5%) und 14 Tiere nur in der Kloakentupferprobe (9,8%) MRSA-Keime auf. Als Träger von MRSASA erwiesen sich 36 Puten (18%), wobei sechs Tiere ein MRSASA-positives Ergebnis in der Trachealtupferprobe und in der Kloakentupferprobe hatten (16,7%), elf Tiere nur in der Trachealtupferprobe (30,6%) und 19 Tiere nur in der Kloakentupferprobe (52,8%).

Die Ergebnisse der Untersuchungen der 20 Betriebe können somit in vier Kategorien eingeteilt und zusammengefasst werden:

- In 16 Betrieben konnten bei den Untersuchungen der Trachealtupfer-, der Kloakentupfer- und der Staubtupferproben MRSA-Keime nachgewiesen werden.
- In einem Betrieb wiesen Staub- und Trachealtupferproben positive MRSA-Ergebnisse auf, nicht aber die Kloakentupferproben.
- In einem Betrieb konnten nur bei den Untersuchungen der Staubtupferproben MRSA-Keime nachgewiesen werden, nicht aber bei den Tracheal- und Kloakentupferproben.
- In zwei Betrieben konnten weder in Tracheal- oder Kloakentupferproben, noch in Staubtupferproben MRSA-Keime nachgewiesen werden.

### Betriebsstruktur

Die Auswertung der Fragebögen ergab, dass in den 20 untersuchten Betrieben im Durchschnitt 7927 Puten eingestallt waren. Die Mastputenhähne erreichten im Durchschnitt ein Gewicht von 18,79kg, die Mastputenhennen von 10,32kg. Die durchschnittliche Futtermittelverwertung betrug 1:2,6. Die Mortalität der Mastputenhähne lag im Durchschnitt bei 10%, die der Mastputenhennen bei 3,95%. In 18 Betrieben wurde die Mastlinie Big 6, in zwei Betrieben die Mastlinie Big 9 gehalten. Die eingestellten Mastputen stammten aus drei verschiedenen Brütereiern, wobei eine Brüterei zwölf, eine Brüterei sieben und eine Brüterei einen Mastbetrieb belieferte. Alle Mastputenbetriebe setzten bei dem beprobten Mastdurchgang im Falle einer bakteriell bedingten Erkrankung, aber mindestens einmal, Antibiotika ein. Die dabei eingesetzten Wirkstoffe waren Enrofloxacin, Benzylpenicillin, Amoxicillin, Colistin, Oxytetracyclin, Neomycin und Tiamulin. Die meisten Ställe waren halboffen und als Einstreumaterial wurden Hobelspäne und Stroh verwendet.

### Betrieb 1

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 1 waren 10320 Hähne der Mastlinie Big 6 eingestallt. Die Mastputenhähne wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein durchschnittliches Lebendgewicht von 20kg bei einer Mortalität von 7,49% und einer Futtermittelverwertung von 1:2,56.

Bei acht Tieren erwiesen sich die Trachealtupferproben und bei fünf Tieren die Kloakentupferproben als MRSA-positiv. Die gepoolte Staubtupferprobe war ebenfalls MRSA-positiv. Zudem enthielt die Trachealtupferprobe eines Tieres und die Kloakentupferproben dreier Tiere MRSASA.

Die drei beprobten Personen des Betriebes waren jeweils MRSA-positiv, wobei sich die Personen A und B täglich im Putenstall aufhielten und die Person C sich nur beim Ausstallen der Puten im Stall aufhielt. Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind und keine der Personen hatte bisher bewusst Kontakt zu MRSA-Trägern. Die Person C war im letzten Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus. Keine der beprobten Personen wurde im letzten Jahr vor der Beprobung mit Antibiotika behandelt.

Tabelle 23 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 1.

Tabelle 23: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 1

t011 = *spa*-Typ t011; V = *SCCmec*-Typ V; ST398 = Sequenztyp 398; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 1	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	negativ	<b>positiv V</b> <i>S. epidermidis</i>
Tier 2	negativ	negativ	negativ	<b>positiv V</b> <i>S. haemolyticus</i>
Tier 3	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 4	negativ	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 5	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 6	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 7	<b>positiv t011, V, ST398</b>	negativ	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. hyicus</i>
Tier 8	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 9	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 10	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv V</b> <i>S. saprophyticus</i>	negativ
Staub	<b>positiv t011, V</b>		Negativ	
Person A	<b>positiv t011, V, ST398</b>		Negativ	
Person B	<b>positiv t011, V</b>		Negativ	
Person C	<b>positiv t011, V</b>		Negativ	

## Betrieb 2

Im dem beprobten Mastdurchgang des Betriebs 2 waren 7000 Hähne der Mastlinie Big 6 eingestallt. Die Mastputenhähne wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh und Hobelspänen als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein durchschnittliches Lebendgewicht von 20,78kg. Die Mortalität betrug 8,3% und die Futtermittelverwertung 1:2,68.

Die Untersuchungen im Betrieb 2 ergaben bei zehn Tieren in Trachealtupferproben und bei acht Tieren in Kloakentupferproben positive MRSA-Nachweise. Die Staubtupferpoolprobe war ebenfalls MRSA-positiv. Zudem erwies sich das Tier Nr. 2 aufgrund positiver Ergebnisse der Tracheal- und Kloakentupferprobe als Träger eines *mecA* positiven *S. haemolyticus*-Stamms.

Die Personen A und B des beprobten Betriebes erwiesen sich als MRSA-Träger, die Person C nicht. Die Personen A und B hielten sich jeden Tag im Putenstall auf, die Person C 15-20 mal pro Mastdurchgang.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind und keine der Personen hatte bisher bewusst Kontakt zu MRSA-Trägern. Keine der drei Personen hielt sich im letzten Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus auf. Nur die Person B wurde im Jahr vor der Beprobung mit Antibiotika behandelt. Tabelle 24 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 2.



Tabelle 24: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 2

t011, t1456, t2330 = *spa*-Typen t011, t1456, t2330; IVa, V = *SCCmec* -Typen IVa und V; ST398 = Sequenztyp 398

Betrieb 2	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	positiv t011, IVa	positiv t1456, IVa	negativ	negativ
Tier 2	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	positiv V <i>S. haemolyticus</i>	positiv III <i>S. haemolyticus</i>
Tier 3	positiv t011, IVa	negativ	negativ	negativ
Tier 4	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 5	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 6	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 7	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 8	positiv t1456, V	negativ	negativ	negativ
Tier 9	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 10	positiv t2330, V, ST398	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Staub	positiv t011, IVa		negativ	
Person A	positiv t011, V		negativ	
Person B	positiv t011, V		negativ	
Person C	negativ		negativ	

### Betrieb 3

In dem beprobten Mastdurchgang des Betriebes 3 waren 3000 Hähne eingestallt. Die Mastputenhähne der Mastlinie Big 6 wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein durchschnittliches Lebendgewicht von 18,3kg. Die Mortalitätsrate lag bei 8%. Angaben über die Futtermittelverwertung der eingestellten Mastputen lagen nicht vor.

Bei vier Tieren erwiesen sich die Trachealtupferproben und bei einem Tier die Kloakentupferprobe als MRSA-positiv. Die gepoolte Staubtupferproben ergaben ebenfalls MRSA-positive Ergebnisse. Keines der zehn Tiere enthielt MRSA in den Tracheal- oder Kloakentupferprobe.

Keine der drei beprobten Personen des Betriebs 3 erwies sich als MRSA-positiv. Die Personen A und B hielten sich jeden Tag im Putenstall auf, die Person C überhaupt nicht. Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (z.B. Krankenhaus o.ä.) tätig sind und keine der Personen hatte bisher bewusst Kontakt zu MRSA-Trägern. Keine der drei Personen hielt sich im letzten Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus auf. Nur die Person A wurde im Jahr vor der Beprobung mit Antibiotika behandelt.

Tabelle 25 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 3.

Tabelle 25: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 3

t011, t002 = *spa*-Typen t011, t002; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ; ST1791 = Sequenztyp 1791

Betrieb 3	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	positiv t002, n.t.	negativ	negativ	negativ
Tier 2	positiv t002, n.t.	negativ	negativ	negativ
Tier 3	negativ	positiv t002, n.t.	negativ	negativ
Tier 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 5	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 6	positiv t002, n.t.	negativ	negativ	negativ
Tier 7	positiv t002, n.t., ST1791	negativ	negativ	negativ
Tier 8	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Staub	positiv t002, n.t.		negativ	
Person A	negativ		negativ	
Person B	negativ		negativ	
Person C	negativ		negativ	

#### Betrieb 4

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 4 waren 8800 Hähne der Mastputenlinie Big 9 eingestallt. Die Mastputenhähne wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh und Hobelspänen als Einstreumaterial gehalten. Die Puten erreichten ein Lebendgewicht von durchschnittlich 20,0kg bei einer Futtermittelverwertung von 1:2,64 und einer Mortalität von 12,5%.

Im Betrieb 4 waren bei allen beprobten Tieren die Tracheal- und Kloakentupferproben MRSA-negativ. Die gepoolte Staubprobe war ebenfalls MRSA-negativ. Die Tiere 1 und 6 erwiesen sich als Träger von MRSASA, wobei bei Tier 1 in der Kloakentupferprobe *S. hyicus* und beim Tier 6 *S. intermedius* isoliert werden konnte. Alle drei beprobten Personen erwiesen sich als MRSA-positiv.

Die Person A hält sich jeden Tag im Putenstall auf, die Person B mehrere Tage pro Woche und die Person C nur während der Aufzucht der Puten.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind und die Personen hatten keinen bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern. Keine der Personen hielt sich im Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus auf. Nur die Person C nahm ein Antibiotikum in dem Jahr vor der Beprobung ein.

Tabelle 26 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 4.

Tabelle 26: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 4

t011 = *spa*-Typ t011; V = *SCCmec*-Typ V; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 4	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	negativ	negativ	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. hyicus</i>
Tier 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 5	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 6	negativ	negativ	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. intermedius</i>
Tier 7	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 8	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Staub	negativ		negativ	
Person A	<b>positiv t011, V</b>		negativ	
Person B	<b>positiv t011, V</b>		negativ	
Person C	<b>positiv t011, V</b>		negativ	

## Betrieb 5

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 5 waren 7200 Hähne eingestallt. Die Mastputenhähne der Mastlinie Big 6 wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh, Spelz und Hobelspänen als Einstreumaterial gehalten. Angaben über das Lebendgewicht, die Futtermittelverwertung und die Mortalitätsrate der eingestellten Mastputen lagen nicht vor.

Bei allen beprobten Tieren erwiesen sich sowohl die Tracheal- als auch die Kloakentupferproben als MRSA-negativ. Die gepoolte Staubtupferprobe war ebenfalls MRSA-negativ.

Die Nasentupferprobe der Person A war MRSASA-positiv, die Nasentupferprobe der Person B MRSA-negativ und die Nasentupferprobe der Person C MRSA-positiv. Die Person A hielt sich mehrere Tage pro Woche im Putenstall auf, die Person B ein mal pro Woche und die Person C nie.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind und die Personen hatten keinen bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern. Die Personen A und B hielten sich in dem Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus auf, im Gegensatz zur Person C, die sich in dem Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus aufhielt. Die Person A nahm in dem Jahr vor der Beprobung ein Antibiotikum ein, die Personen B und C hingegen nicht.

Tabelle 27 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 5.

Tabelle 27: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 5

t011 = *spa*-Typ t011; IVa, V = *SCCmec*-Typen IVa und V

Betrieb 5	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 5	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 6	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 7	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 8	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Staub	negativ		negativ	
Person A	negativ		<b>positiv V <i>S. haemolyticus</i></b>	
Person B	negativ		negativ	
Person C	<b>positiv t011, IVa</b>		negativ	

### Betrieb 6

In dem beprobten Mastdurchgang des Betriebes 6 waren 3262 Hähne eingestallt. Die Mastputenhähne der Mastlinie Big 6 wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh und Hobelspänen als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein durchschnittliches Lebendgewicht von 20,61kg. Die Mortalität betrug 10,45% und die Futtermittelverwertung 1:2,61.

Bei zehn Tieren ergaben die Trachealtupferproben und bei sechs Tieren die Kloakentupferproben positive MRSA-Ergebnisse. Die Staubtupferpoolprobe war ebenfalls MRSA-positiv. Tier 4 (*S. saprophyticus*) und 10 (*S. haemolyticus*) waren zudem noch MRSASA-positiv in der Trachealtupferprobe.

Die Personen A und B erwiesen sich als MRSA-positiv, die Person C als MRSA-negativ. Während sich Person A jeden Tag im Putenstall aufhielt, waren es bei Person B mehrere Tage pro Woche. Person C hielt sich hingegen nur beim Verladen der Tiere am Ende der Mast im Putenstall auf.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind und keine der Personen hatte bisher bewusst Kontakt zu MRSA-Trägern. Keine der drei Personen hielt sich im letzten Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus auf oder wurde im Jahr vor der Beprobung mit Antibiotika behandelt.

Tabelle 28 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 6.

Tabelle 28: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 6

t011 = *spa*-Typ t011; V = *SCCmec*-Typ V

Betrieb 6	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	positiv t011, V	negativ	negativ	negativ
Tier 2	positiv t011, V	positiv t011,V	negativ	negativ
Tier 3	positiv t011, V	negativ	negativ	negativ
Tier 4	positiv t011, V	positiv t011,V	positiv V <i>S. saprophyticus</i>	negativ
Tier 5	positiv t011, V	negativ	negativ	negativ
Tier 6	positiv t011, V	positiv t011,V	negativ	negativ
Tier 7	positiv t011, V	positiv t011,V	negativ	negativ
Tier 8	positiv t011, V	negativ	negativ	negativ
Tier 9	positiv t011, V	positiv t011,V	negativ	negativ
Tier 10	positiv t011, V	positiv t011,V	positiv V <i>S. haemolyticus</i>	negativ
Staub	positiv t011, V		negativ	
Person A	positiv t011, V		negativ	
Person B	positiv t011, V		negativ	
Person C	negativ		negativ	

## Betrieb 7

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 7 waren 7000 Hennen der Mastlinie Big 6 eingestallt. Die Mastputenhennen wurden in einem halboffenen Stall mit Hobelspänen und Stroh als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein Lebendgewicht von zehn Kilogramm. Angaben über die Futtermittelverwertung und die Mortalitätsrate der eingestellten Mastputen waren nicht vorhanden.

Die Untersuchungen im Betrieb 7 ergaben bei zehn Tieren MRSA-positive Trachealtupferproben und bei vier Tieren MRSA-positive Kloakentupferproben. Die gepoolte Staubtupferprobe war ebenfalls MRSA-positiv. Die Kloakentupferprobe eines der zehn Tiere erwies sich als MRSASA (*S. saprophyticus*) positiv.

Die Personen A und B waren MRSA-positiv, die Person C MRSA-negativ. Die Personen A und B hielten sich jeden Tag im Putenstall auf, die Person C hielt sich nie im Putenstall auf.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung tätig sind und keine der Personen hatte bisher bewusst Kontakt zu MRSA-Trägern. Alle drei Personen hielten sich im letzten Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus auf und keine Person wurde in dieser Zeit mit Antibiotika behandelt.

Tabelle 29 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 7.



Tabelle 29: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 7

t011, t002 = *spa*-Typen t011, t002; IVa = *SCCmec*-Typ IVa; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 7	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	positiv t011, IVa	negativ	negativ	negativ
Tier 2	positiv t011, IVa	positiv t002, n.t.	negativ	negativ
Tier 3	positiv t002, n.t.	negativ	negativ	negativ
Tier 4	positiv t011, IVa	positiv t002, n.t.	negativ	negativ
Tier 5	positiv t011, IVa	negativ	negativ	negativ
Tier 6	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 7	positiv t002, n.t.	negativ	negativ	negativ
Tier 8	positiv t011, IVa	positiv t002, n.t.	negativ	positiv n.t. <i>S. saprophyticus</i>
Tier 9	positiv t011, IVa	negativ	negativ	negativ
Tier 10	positiv t011, IVa	negativ	negativ	negativ
Staub	positiv t011, IVa		negativ	
Person A	positiv t011, IVa		negativ	
Person B	positiv t011, IVa		negativ	
Person C	negativ		negativ	

## Betrieb 8

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 8 waren 8000 Hähne eingestallt. Die Mastputenhähne der Mastlinie Big 6 wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein Lebendgewicht von durchschnittlich 15,3kg. Angaben über die Futterverwertung und die Mortalitätsrate der eingestellten Mastputen waren nicht vorhanden.

Bei neun Tieren erwiesen sich die Trachealtupferproben und bei fünf Tieren die Kloakentupferproben als MRSA-positiv. Die gepoolte Staubprobe war ebenfalls MRSA-positiv. Zudem enthielten die Trachealtupferproben von sechs und die Kloakentupferproben von vier Tieren MRSASA.

Von der Person A ist keine Nasentupferprobe vorhanden. Die Nasentupferproben der Person B war MRKNS positiv. Die Nasentupferproben der Person C war negativ. Die Person B hielt sich mehrere Tage pro Woche, Person C hingegen nie im Putenstall auf.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind und keine der Personen hatte bisher bewusst Kontakt zu MRSA-Trägern. Die beiden Personen hielten sich im letzten Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus auf und keine Person wurde in dieser Zeit mit Antibiotika behandelt.

Tabelle 30 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 8.

Tabelle 30: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 8

t1456 = *spa*-Typ 1456; V = *SCCmec*-Typ V; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ;  
 ST398 = Sequenztyp 398

Betrieb 8	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	positiv t1456, V	negativ	positiv n.t. <i>S. saprophyticus</i>	positiv V <i>S. haemolyticus</i>
Tier 2	negativ	negativ	positiv V <i>S. haemolyticus</i>	positiv n.t. <i>S. saprophyticus</i>
Tier 3	positiv t1456, V, ST398	positiv t1456, V	positiv V <i>S. haemolyticus</i>	negativ
Tier 4	positiv t1456, V	positiv t1456, V	positiv n.t. <i>S. saprophyticus</i>	negativ
Tier 5	positiv t1456, V	negativ	positiv V <i>S. haemolyticus</i>	negativ
Tier 6	positiv t1456, V	positiv t1456, V	negativ	negativ
Tier 7	positiv t1456, V	negativ	negativ	positiv V <i>S. haemolyticus</i>
Tier 8	positiv t1456, V	negativ	negativ	positiv V <i>S. haemolyticus</i>
Tier 9	positiv t1456, V	positiv t1456, V	negativ	negativ
Tier 10	positiv t1456, V	positiv t1456, V	positiv V <i>S. haemolyticus</i>	negativ
Staub	positiv t1456, V		negativ	
Person A	nicht vorhanden		nicht vorhanden	
Person B	negativ		positiv IVa, <i>S. epidermidis</i>	
Person C	negativ		negativ	

## Betrieb 9

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 9 waren 17500 Hennen der Mastlinie Big 6 eingestallt. Die Mastputenhennen wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein durchschnittliches Lebendgewicht von 10,8kg bei einer Futtermittelverwertung von 1:2,63 und einer Mortalität von 3,05%.

Im Betrieb 9 ergaben die Untersuchungen bei neun Tieren in Trachealtupferproben und bei sechs Tieren in Kloakentupferproben positive MRSA-Nachweise. Die gepoolte Staubtupferprobe war ebenfalls MRSA-positiv. Die Tiere 2 und 4 wiesen in den Trachealtupferproben und die Tiere 1, 3 und 5 in den Kloakentupferproben MRSA-Keime auf.

Die Personen A und B des beprobten Betriebes erwiesen sich als MRSA-Träger, die Person C nicht. Die Personen A und B hielten sich jeden Tag, die Person C einmal im Monat im Putenstall auf.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind. Die Personen B und C hatten bisher keinen bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern. Die Person A machte darüber keine Angaben. Alle drei Personen hielten sich im letzten Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus auf und die Personen A und B wurden in dieser Zeit nicht mit Antibiotika behandelt. Die Person C machte keine Angaben über Antibiotika-Behandlungen.

Tabelle 31 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 9.

Tabelle 31: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 9

t002, t011 = *spa*-Typen t002, t011; IVa, V = *SCCmec*-Typen IVa, V; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ; ST398 = Sequenztyp 398

Betrieb 9	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	negativ	negativ	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. saprophyticus</i>
Tier 2	<b>positiv t002, n.t.</b>	<b>positiv t011, IVa</b>	<b>positiv n.t.</b> <i>S. saprophyticus</i>	negativ
Tier 3	<b>positiv t002, n.t.</b>	negativ	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. saprophyticus</i>
Tier 4	<b>positiv t011, IVa</b>	<b>positiv t002, n.t.</b>	<b>positiv n.t.</b> <i>S. saprophyticus</i>	negativ
Tier 5	<b>positiv t011, IVa</b>	<b>positiv t011, n.t.</b>	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. saprophyticus</i>
Tier 6	<b>positiv t011, IVa</b>	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ
Tier 7	<b>positiv t011, IVa</b>	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ
Tier 8	<b>positiv t011, IVa</b>	<b>positiv t002, n.t.</b>	negativ	negativ
Tier 9	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 10	<b>positiv t002, n.t.</b>	negativ	negativ	negativ
Staub	<b>positiv t002, n.t.</b>		negativ	
Person A	<b>positiv t034, V, ST398</b>		negativ	
Person B	<b>positiv t1456, V, ST398</b>		negativ	
Person C	negativ		negativ	

## Betrieb 10

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 10 waren 5000 Hähne eingestallt. Die Mastputenhähne der Mastlinie Big 6 wurden in einem offenen Stall mit Stroh und Hobelspänen als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein Lebendgewicht von durchschnittlich 19,89kg bei einer Futtermittelverwertung von 1:2,0 und einer Mortalität von 5%.

Bei zehn Tieren erwiesen die Trachealtupferproben und bei neun Tieren die Kloakentupferproben MRSA-positive Ergebnisse. Die gepoolte Staubtupferprobe war ebenfalls MRSA-positiv.

Die Personen A und B waren MRSA-positiv, die Nasentupferprobe der Person C enthielt MRSA. Während sich die Person A jeden Tag im Putenstall aufhielt, waren es bei der Person B mehrere Tage pro Woche, während sich die Person C nie im Putenstall aufhielt. Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind. Alle drei Personen machten keine Angaben darüber, ob sie bisher bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern hatten und ob sie sich im letzten Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus aufhielten. Person A gab an, sich im letzten Jahr keiner Antibiotika-Therapie unterzogen zu haben, während die Personen B und C hierzu keine Angaben machten.

Tabelle 32 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 10.

Tabelle 32: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 10

t002, t011 = *spa*-Typen t002, t011; IVa, V, III = *SCCmec*-Typen IVa, V, III; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 10	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	positiv t002, n.t.	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 2	positiv t011, V	negativ	negativ	negativ
Tier 3	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 4	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 5	positiv t002, n.t.	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 6	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 7	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 8	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 9	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 10	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Staub	positiv t002 n.t.		negativ	
Person A	positiv t011, IVa		negativ	
Person B	positiv t011, V		negativ	
Person C	negativ		positiv III <i>S. haemolyticus</i>	

## Betrieb 11

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 11 waren 7200 Hennen der Mastlinie Big 6 eingestallt. Die Mastputenhennen wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh und Hobelspänen als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein Lebendgewicht von durchschnittlich 10,2kg. Angaben über die Futtermittelverwertung und die Mortalitätsrate waren nicht vorhanden.

Die Untersuchungen ergaben bei sechs Tieren in den Trachealtupferproben und bei einem Tier in der Kloakentupferprobe positive MRSA-Nachweise. Die gepoolte Staubtupferprobe war ebenfalls MRSA-positiv. Zudem enthielten die Trachealtupferproben bei zwei Tieren und die Kloakentupferproben bei fünf Tieren MRSASA.

Die Nasentupferproben aller drei beprobten Personen waren MRSA-negativ. Die Person A hielt sich jeden Tag, die Person B mehrere Tage pro Woche und die Person C zweimal im Monat im Putenstall auf.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind. Alle drei Personen hatten bisher keinen bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern. Nur Person B hielt sich in dem Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus auf. Im Gegensatz zur Person A wurden die Personen B und C im Jahr vor der Beprobung mit einem Antibiotika behandelt.

Tabelle 33 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 11.



Tabelle 33: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 11

t011 = *spa*-Typ t011; IVa, V = *SCCmec*-Typen IVa, V; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 11	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	<b>positiv t011, V</b>	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. haemolyticus</i>	negativ
Tier 2	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. intermedius</i>
Tier 3	negativ	negativ	<b>positiv V</b> <i>S. haemolyticus</i>	<b>positiv n.t.</b> <i>S. hyicus</i>
Tier 4	negativ	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ
Tier 5	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. haemolyticus</i>
Tier 6	negativ	negativ	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. haemolyticus</i>
Tier 7	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ	<b>positiv n.t.</b> <i>S. hyicus</i>
Tier 8	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 9	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Staub	<b>positiv t011, V</b>		negativ	
Person A	negativ		negativ	
Person B	negativ		negativ	
Person C	negativ		negativ	

## Betrieb 12

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 12 waren 6000 Hennen der Mastlinie Big 6 eingestallt. Die Mastputenhennen wurden in einem halboffenen Stall mit Hobelspänen und Stroh als Einstreumaterial gehalten. Die Puten erreichten ein durchschnittliches Lebendgewicht von 10kg bei einer Mortalität von 3%. Angaben über die Futtermittelverwertung der eingestellten Mastputen waren nicht vorhanden.

Bei einem Tier erwies sich die Trachealtupferprobe als MRSA-positiv, bei keinem Tier jedoch die Kloakentupferproben. Die gepoolte Staubtupferprobe war ebenfalls MRSA-positiv.

Alle drei beprobten Personen erwiesen sich als MRSA-negativ. Die Nasentupferprobe der Person C enthielt *mecA*-Gen positive *S. epidermidis*-Stämme. Die Person A hielt sich jeden Tag, die Person B einmal pro Woche und die Person C nur beim Verladen der Puten, ca. 6-8 mal pro Jahr, im Putenstall auf.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind und keine der Personen hat Angaben darüber gemacht, ob sie bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern hatte. Während sich die Personen A und C ein Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus aufgehalten haben, hatte die Person B in dem Jahr vor der Beprobung einen Krankenhausaufenthalt. Die Personen A und C nahmen in dem Jahr vor der Beprobung Antibiotika ein, Person B hingegen nicht. Tabelle 34 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 12.

Tabelle 34: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 12

t011 = *spa*-Typ t011; IVa, V = *SCCmec*-Typ IVa, V; n.t. = nicht typisierbare *SCCmec*-Typ

Betrieb 12	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 5	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 6	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 7	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 8	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 10	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ	negativ
Staub	<b>positiv t011, V</b>		negativ	
Person A	negativ		negativ	
Person B	negativ		negativ	
Person C	negativ		<b>positiv n.t. <i>S. epidermidis</i></b>	

### Betrieb 13

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 13 waren 9500 Hähne eingestallt. Die Mastputenhähne der Mastlinie Big 6 wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh und Spänen als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein Lebendgewicht von durchschnittlich 18kg. Angaben über die Futtermittelverwertung und die Mortalitätsrate waren nicht vorhanden.

Es erwiesen sich bei allen zehn Tieren sowohl die Trachealtupferproben als auch die Kloakentupferproben als MRSA-positiv. Die gepoolte Staubtupferprobe war ebenfalls MRSA-positiv und enthielt *mecA*-Gen positive *S. saprophyticus*-Stämme. Das Tier 5 erwies sich zudem als Träger eines *mecA*-Gen positiven *S. saprophyticus*-Isolats (Trachealtupferprobe).

Die Person A erwies sich als MRSA-negativ, die Personen B und C hingegen als positiv. Die Person A hielt sich jeden Tag im Putenstall auf, die Person B mehrere Tage pro Woche und die Person C nur bei der Einstellung der Puten.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind. Alle drei Personen hatten bisher keinen bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern. Die Personen A und B hielten sich in dem Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus auf, die Person C machte dazu keine Angaben. Die Personen B und C wurden im Jahr vor der Beprobung mit Antibiotika behandelt, die Person A nicht. Tabelle 35 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 13.

Tabelle 35: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 13

t011 = *spa*-Typ t011; V = *SCCmec*-Typ V; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 13	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 2	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 3	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 4	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 5	positiv t011, V	positiv t011, V	positiv n.t. <i>S. saprophyticus</i>	negativ
Tier 6	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 7	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 8	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 9	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 10	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Staub	positiv t011, V		positiv n.t., <i>S. saprophyticus</i>	
Person A	negativ		negativ	
Person B	positiv t011, V		negativ	
Person C	positiv t011, V		negativ	

#### Betrieb 14

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 14 waren 5000 Hähne der Mastlinie Big 6 eingestallt. Die Mastputenhähne wurden in einem halboffenen Stall mit Stroh als Einstreumaterial gehalten. Die Puten erreichten ein Lebendgewicht von durchschnittlich 20,5kg bei einer Mortalität von 11%. Angaben über die Futtermittelverwertung der eingestellten Puten waren nicht vorhanden.

Bei der Untersuchung des Betriebes 14 erwies sich kein Tier, wohl aber die gepoolte Staubtupferprobe als MRSA-positiv. Bei keiner der beprobten Personen konnte in der Nasentupferprobe MRSA-Keime nachgewiesen werden. Die Person A hielt sich jeden Tag im Putenstall auf, die Person B mehrere Tage pro Woche und die Person C 5-6 mal pro Jahr.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind. Die Personen B und C haben keine Angaben darüber gemacht, ob sie bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern hatten, die Person A hatte keinen Kontakt zu MRSA-Trägern. Keine der Personen hat sich in dem Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus aufgehalten. Die Personen A und B haben im Jahr der Beprobung im Gegensatz zu Person C kein Antibiotikum eingenommen. Alle drei Personen trugen bei der Arbeit im Putenstall immer FFP2 Staubmasken.

Tabelle 36 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 14.

Tabelle 36: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 14

t011 = *spa*-Typ t011; IVa = *SCCmec*-Typ IVa

Betrieb 14	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 5	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 6	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 7	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 8	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Staub	<b>positiv t011, Iva</b>		negativ	
Person A	negativ		negativ	
Person B	negativ		negativ	
Person C	negativ		negativ	

### Betrieb 15

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 15 waren 3000 Hennen eingestallt. Die Mastputenhennen der Mastlinie Big 6 wurden in einem halboffenen Stall mit Hobelspänen als Einstreumaterial gehalten und erreichten am Ende der Mast ein durchschnittliches Lebendgewicht von 10,21kg bei einer Futtermittelverwertung von 1:2,72 und einer Mortalität von 4,8%.

Bei neun Tieren erwiesen sich die Trachealtupferproben und bei acht Tieren die Kloakentupferproben als MRSA-positiv. Die gepoolte Staubprobe war ebenfalls MRSA-positiv.

Die Nasentupferprobe der Person A erwies sich als MRSA-positiv, die Nasentupferproben der Personen B und C hingegen als negativ. Die Person A hielt sich jeden Tag im Putenstall auf, die Person B mehrere Tage pro Woche und die Person C nie. Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung tätig sind. Alle drei Personen machten keine Angaben darüber, ob sie bisher bewussten Kontakt zu

MRSA-Trägern hatten. Keine der Personen hielt sich in dem Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus auf. Die Personen A und C wurden im Jahr vor der Beprobung mit Antibiotika behandelt, die Person B nicht.

Tabelle 37 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 15.

Tabelle 37: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 15

t011 = *spa*-Typ t011; IVa = *SCCmec*-Typen IVa; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 15	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 2	negativ	<b>positiv t011, n.t.</b>	negativ	negativ
Tier 3	<b>positiv t011, n.t.</b>	<b>positiv t011, n.t.</b>	negativ	negativ
Tier 4	<b>positiv t011, n.t.</b>	<b>positiv t011, n.t.</b>	negativ	negativ
Tier 5	<b>positiv t011, n.t.</b>	<b>positiv t011, n.t.</b>	negativ	negativ
Tier 6	<b>positiv t011, n.t.</b>	<b>positiv t011, n.t.</b>	negativ	negativ
Tier 7	<b>positiv t011, n.t.</b>	<b>positiv t011, n.t.</b>	negativ	negativ
Tier 8	<b>positiv t011, n.t.</b>	<b>positiv t011, n.t.</b>	negativ	negativ
Tier 9	<b>positiv t011, n.t.</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 10	<b>positiv t011, IVa</b>	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ
Staub	<b>positiv t011, IVa</b>		negativ	
Person A	<b>positiv t011, IVa</b>		negativ	
Person B	negativ		negativ	
Person C	negativ		negativ	

## Betrieb 16

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 16 waren 20000 Hennen eingestallt. Die Mastputenhennen der Mastlinie Big 6 wurden in einem halboffenen Stall mit Hobelspänen und Stroh als Einstreumaterial gehalten.

Im Betrieb 16 ergaben die Untersuchungen der Trachealtupferproben bei drei Tieren und die Kloakentupferproben bei ebenfalls drei Tieren positive MRSA-Ergebnisse. Die Staubtupferpoolprobe war MRSA-positiv. Bei dem Tier 4 konnten zudem MRSASA in der Trachealtupferprobe und bei vier weiteren Tieren in den Kloakentupferproben nachgewiesen werden.

Die Person A und B erwiesen sich als Träger von MRSASA, während Person C negativ getestet wurde. Während sich Person A jeden Tag im Putenstall aufhielt, waren es bei Person B mehrere Tage pro Woche. Die Person C hielt sich nie im Putenstall auf.

Bei der Person A lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind, bei den anderen beiden Personen nicht. Die Person A hatte keinen bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern, die anderen beiden Personen haben hierzu keine Angaben gemacht. Die Personen A und B hielten sich im Gegensatz zu Person C im Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus auf. Während die Personen A und B im Jahr vor der Beprobung nicht mit Antibiotika behandelt wurden, war dies bei Person C der Fall.

Tabelle 38 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 16.



Tabelle 38: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 16

t011 = *spa*-Typ t011; V = *SCCmec*-Typ V; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 16	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 2	negativ	negativ	negativ	<b>positiv V</b> <i>S. haemolyticus</i>
Tier 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 4	negativ	negativ	<b>positiv V</b> <i>S. saprophyticus</i>	<b>positiv V</b> <i>S. haemolyticus</i>
Tier 5	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 6	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 7	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	negativ	<b>positiv V</b> <i>S. saprophyticus</i>
Tier 8	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ	<b>positiv V</b> <i>S. haemolyticus</i>
Tier 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 10	negativ	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Staub	<b>positiv t011, V</b>		negativ	
Person A	negativ		<b>positiv n.t.</b> <i>S. epidermidis</i>	
Person B	negativ		<b>positiv n.t.</b> <i>S. epidermidis</i>	
Person C	negativ		negativ	

## Betrieb 17

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebs 17 waren 8.500 Hennen eingestallt. Die Mastputenhennen der Mastlinie Big 6 wurden in einem halboffenen Stall mit Dinkelspelz und Stroh als Einstreumaterial gehalten. Die Puten erreichten ein Lebendgewicht von durchschnittlich 10,5kg bei einer Futtermittelverwertung von 1:2,9 und einer Mortalität von 2,7%.

Im Betrieb 17 waren bei sieben Tieren die Trachealtupferproben und bei fünf Tieren die Kloakentupferproben MRSA-positiv. Die gepoolte Staubtupferprobe war ebenfalls MRSA-positiv.

Die Nasentupferproben der Personen A und C waren MRSA-negativ, die Nasentupferproben der Person B jedoch MRSA und MRSASA-positiv. Die Person A hielt sich jeden Tag im Putenstall auf, die Person B mehrere Tage pro Woche und die Person C ein bis zwei mal pro Mastdurchgang.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind und keine der Personen hat bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern. Alle drei Personen haben sich ein Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus aufgehalten oder eine Antibiotika-Behandlung benötigt. Die Personen A und B haben außer zu Puten auch Kontakt zu Schweinen, bei denen ebenfalls, über eine andere Studie, MRSA nachgewiesen wurden. Die Person C hat keinen Kontakt zu diesen Schweinen.

Tabelle 39 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 17.

Tabelle 39: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 17

t011, t034 = *spa*-Typen t011, t034; V = *SCCmec*-Typ V; ST398 = Sequenztyp 398

Betrieb 17	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 2	negativ	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Tier 4	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 5	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 6	<b>positiv t034, V, ST398</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 7	negativ	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 8	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 9	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 10	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Staub	<b>positiv t034, V</b>		negativ	
Person A	negativ		negativ	
Person B	<b>positiv t011, V</b>		<b>positiv V, <i>S. haemolyticus</i></b>	
Person C	negativ		negativ	

## Betrieb 18

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 18 waren 5.400 Hennen der Mastlinie Big 6 eingestallt. Die Mastputenhennen wurden in einem halboffenen Stall mit Hobelspänen und Stroh als Einstreumaterial gehalten. Sie erreichten ein durchschnittliches Lebendgewicht von 11kg bei einer Mortalität von 5%. Angaben über die Futtermittelverwertung der Puten waren nicht vorhanden.

Die Untersuchungen ergaben bei vier Tieren in den Trachealtupferproben und bei acht Tieren in den Kloakentupferproben positive MRSA-Nachweise. Die Staubtupferpoolprobe war ebenfalls MRSA-positiv.

Alle drei beprobten Personen erwiesen sich nicht als MRSA-Träger. Die Person A hält sich jeden Tag, die Person B mehrere Tage pro Woche und die Person C nie im Putenstall auf.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind und keine der Personen hatte bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern. Alle drei Personen hielten sich ein Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus auf. Im Gegensatz zu den Personen A und B hat Person C im Jahr vor der Beprobung Antibiotika eingenommen.

Tabelle 40 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 18.

Tabelle 40: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 18

t002, t011 = *spa*-Typ t002, t011; IVa, V = *SCCmec*-Typen IVa, V; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 18	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	negativ	<b>positiv t002, n.t.</b>	negativ	negativ
Tier 2	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 3	negativ	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 4	negativ	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 5	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 6	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ	negativ
Tier 7	negativ	<b>positiv t011, IVa</b>	negativ	negativ
Tier 8	negativ	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 9	negativ	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Tier 10	<b>positiv t011, V</b>	<b>positiv t011, V</b>	negativ	negativ
Staub	<b>positiv t011, n.t.</b>		negativ	
Person A	negativ		negativ	
Person B	negativ		negativ	
Person C	negativ		negativ	

### Betrieb 19

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebs 19 waren 4000 Hennen eingestallt. Die Mastputenhennen der Mastlinie Big 9 wurden in einem halboffenen Stall mit Hobelspänen und Stroh als Einstreumaterial gehalten. Die Puten erreichten ein Lebendgewicht von durchschnittlich 10,1kg bei einer Futterverwertung von 1:2,6 und einer Mortalität von 5%.

Bei neun Tieren ergaben die Trachealtupferproben und bei neun Tieren die Kloakentupferproben MRSA-positive Ergebnisse. Die gepoolte Staubtupferprobe war ebenfalls MRSA-positiv.

Keine der beprobten Personen erwies sich als MRSA-positiv. Die Person A hielt sich jeden Tag im Putenstall auf, die Person B ein mal pro Woche und die Person C nur beim Umstallen.

Bei keiner der Personen lebten Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung tätig sind und keine der Personen hatte bewussten Kontakt zu MRSA-Trägern. Alle drei

Personen hielten sich im Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus auf oder hatten eine Antibiotika-Therapie in Anspruch nehmen müssen.

Tabelle 41 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, des Staubes und der drei beprobten Personen des Betriebes 19.

Tabelle 41: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 19

t011 = *spa*-Typ t011; IVa, V = *SCCmec* -Typen IVa, V; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 19	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	positiv t011, n.t.	negativ	negativ	negativ
Tier 2	positiv t011, n.t.	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 3	negativ	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 4	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 5	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 6	positiv t011, V	positiv t011, V	negativ	negativ
Tier 7	positiv t011, V	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 8	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 9	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 10	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Staub	positiv t011, IVa		negativ	
Person A	negativ		negativ	
Person B	negativ		negativ	
Person C	negativ		negativ	

## Betrieb 20

Im beprobten Mastdurchgang des Betriebes 20 waren 8200 Hennen eingestallt. Die Mastputenhennen der Mastlinie Big 6 wurden in einem halboffenen Stall mit Hobelspänen und Stroh als Einstreumaterial gehalten. Die Puten erreichten ein durchschnittliches Lebendgewicht von 10,9 kg bei einer Futtermittelverwertung von 1:2,46 und einer Mortalität von 1,7%.

Die Untersuchungen ergaben bei allen zehn Tieren sowohl in den Trachealtupferproben als auch den Kloakentupferproben positive MRSA-Nachweise. Die Staubtupferpoolprobe war ebenfalls MRSA-positiv. Zudem erwiesen sich die Tiere 3 und 8 aufgrund positiver Ergebnisse der Kloakentupferproben als Träger eines *mecA*-Gen positiven *S. haemolyticus*-Isolats.

Die Person A des beprobten Betriebes erwies sich als MRSA-positiv und die Person B erwies sich als Träger eines *mecA*-Gen positiven *S. epidermidis*-Isolats. Die Person C war MRSA-negativ. Die Personen A und B hielten sich jeden Tag im Putenstall auf, die Person C hingegen nie.

Bei den Personen A und B lebten keine Menschen im Haushalt, die in der Patientenversorgung (Krankenhaus o.ä.) tätig sind. Die Person C ist Krankenschwester und hat dadurch Kontakt zu humanen MRSA-Trägern. Die Personen A und B machten keine Angaben darüber, ob sie Kontakt zu humanen MRSA-Trägern haben. Die Person C hat sich in dem Jahr vor der Beprobung im Krankenhaus aufgehalten und hat Antibiotika zu sich genommen. Die Personen A und B hielten sich ein Jahr vor der Beprobung nicht im Krankenhaus auf und nahmen auch keine Antibiotika ein.

Tabelle 42 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der beprobten Tiere, der Staubproben und der drei beprobten Personen des Betriebes 20.

Tabelle 42: Ergebnisse der Untersuchungen auf MRS-Keime in Betrieb 20

t011 = *spa*-Typ t011; IVa, V = *SCCmec*-Typ IVa, V; n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Betrieb 20	MRSA		MRSASA	
	Trachealproben	Kloakenproben	Trachealproben	Kloakenproben
Tier 1	positiv t011, V	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 2	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 3	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	<b>positiv V</b> <i>S. haemolyticus</i>
Tier 4	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 5	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 6	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 7	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 8	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	<b>positiv V</b> <i>S. haemolyticus</i>
Tier 9	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Tier 10	positiv t011, IVa	positiv t011, IVa	negativ	negativ
Staub	positiv t011, IVa		negativ	
Person A	positiv t011, V		negativ	
Person B	negativ		<b>positiv n.t., <i>S. epidermidis</i></b>	
Person C	negativ		negativ	



#### 4.1.6 Ergebnisse der beprobten Personen

In 20 Betrieben mit Ausnahme eines Betriebes konnten bei drei Personen je Betrieb (in Betrieb 8 nur zwei Personen) jeweils ein Nasentupfer für den Nachweis von MRS entnommen werden. Von den 59 beprobten Personen erwiesen sich 22 Personen MRSA-positiv (37,3%), die sich auf zwölf Putenmastbetriebe verteilten. Von diesen kamen in zehn Betrieben auch positive Puten vor. In zwei Betrieben mit MRSA-positiven Personen konnten in einem Betrieb nur MRSASA-, nicht aber MRSA-Keime, in dem anderen Betrieb weder MRSA-, noch MRSASA-Keime bei den Tieren nachgewiesen werden. Bei acht (13,6 %) der beprobten Personen gelang der Nachweis von MRSASA. Bei einer dieser Personen konnten sowohl MRSA- als auch MRSASA-Keime kultiviert werden. Die acht MRSASA-positiven Personen lebten verteilt auf sieben Betrieben. In drei dieser Betriebe konnten auch MRSASA-Keime bei den Puten isoliert werden. In weiteren drei Betrieben konnten nur MRSA-Keime bei den Puten isoliert werden und in einem Betrieb konnten weder MRSA-, noch MRSASA-Keime bei den Puten nachgewiesen werden. Betrachtet man die Häufigkeit des Stallaufenthaltes, so hielten sich 39 Personen regelmäßig (täglich, mehrmals oder mindestens einmal pro Woche) und 20 Personen nur selten (weniger als einmal pro Woche) oder nie in den Putenställen auf. Die Chance (Verhältnis der Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis eintritt zur Wahrscheinlichkeit, dass das Ereignis nicht eintritt) (Bender und Lange, 2007) der Besiedlung mit MRSA ist bei Personen, die sich regelmäßig in Putenställen aufhielten, im Vergleich zu Personen, die sich nur selten oder nie in Putenställen aufhielten, deutlich erhöht (OR = 3,43, Konfidenzlevel 95%, Konfidenzintervall 0,0994 - 11,71). Die Tabelle 43 gibt eine Übersicht über die Verteilung von MRSA- und MRKNS- Isolaten bei den Personen in Abhängigkeit der Dauer der Aufenthalte in den beprobten Putenstallungen.

Tabelle 43: Übersicht über die Verteilung MRSA und MRSASA in Nasentupferproben von Personen aus den untersuchten Putenbetrieben in Abhängigkeit von der Dauer des Aufenthalts in den Puten-Stallungen

<b>Aufenthalt der Personen im Stall</b>	<b>Anzahl beprobter Personen</b>	<b>MRSA positiv</b>	<b>MRSASA positiv</b>	<b>MRSA und MRSASA positiv</b>	<b>Negativ</b>
Regelmäßig (täglich, mehrere Tage pro Woche oder mindestens einmal pro Woche)	39	17	5	1	16
Selten (weniger als einmal pro Woche) oder nie	20	4	2	0	14

#### 4.1.7 Ergebnisse der molekularen Typisierung

Alle 317 im Rahmen dieser Studie von Tieren, aus den Stallungen sowie von Personen isolierten MRSA-Stämme wurden im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) molekularbiologisch mittels *spa*- und *SCCmec*-Typisierung charakterisiert, um eine Aussage über eine mögliche Übereinstimmung der einzelnen Stämme bei Tieren (Tracheal- oder Kloakentupferproben), im Stallstaub und den beprobten Personen treffen zu können. Von 267 MRSA-Stämmen konnten mit einem Anteil von 83,9% (n = 224) der *spa*-Typ t011 am häufigsten detektiert werden. Andere *spa*-Typen wie t002 mit 7,9% (n = 21), t1456 mit 6,7% (n = 18), t034 mit 1,1% (n = 3) und t2330 mit 0,4% (n = 1) stellen einen vergleichsweise geringen Anteil der detektierten *spa*-Typen dar. Bei den *SCCmec*-Typen kam mit 54,7% (n = 146) der Typ V am häufigsten vor, gefolgt vom *SCCmec*-Typ IVa mit 31,1% (n = 83). Insgesamt waren bei 14,2% (n = 38) der typisierten MRSA-Stämme der *SCCmec*-Typ nicht typisierbar.

Unter den *spa*- und *SCCmec*-Typkombinationen erwiesen sich 125 (46,8%) Stämme als *spa*-Typ t011 und *SCCmec*-Typ V, 82 (30,7%) Stämme als *spa*-Typ t011 und *SCCmec*-Typ IVa, 21 (7,8%) Stämme als *spa*-Typ t002 verbunden mit einem nicht darstellbarem *SCCmec*-Typ, 17 (6,4%) Stämme als *spa*-Typ t1456 und *SCCmec*-Typ V, 17 (6,4%) Stämme als *spa*-Typ t011 (*SCCmec*-Typ nicht typisierbar), drei (1,1%) Stämme als *spa*-Typ t034 und *SCCmec*-Typ V, 1 (0,4%) Stamm als *spa*-Typ t1456 und *SCCmec*-Typ IVa und ein (0,4%) Stamm als *spa*-Typ t2330 und *SCCmec*-Typ V.

Betrachtet man die Vielfalt der Typen der MRSA-Isolate, so ist die der Tracheal- oder Kloakentupferproben deutlich größer als die der Staubpoolproben. Von den 84 Tieren, die sowohl in der Tracheal- wie auch in der Kloakentupferprobe MRSA-positiv waren, konnten bei 70 Tieren (83,3%) die gleichen *spa*- und *SCCmec*-Typkombinationen in der Tracheal- und in der Kloakentupferprobe nachgewiesen werden. 14 Tiere (16,7%) zeigten unterschiedliche *spa*- und *SCCmec*-Typkombinationen in der Tracheal- und in der Kloakentupferprobe.

Zusätzlich wurden acht MRSA-Isolate von Puten und Personen einer MLST-Typisierung unterzogen. Bei sieben Isolaten konnten die *spa*-Typen – t011, t034, t1456 und t2330 – dem Sequenztyp ST398 zugeordnet werden. Bei einem Isolat aus einer Trachealtupferprobe einer Pute mit dem *spa*-Typ t002 konnte der Sequenztyp ST1791 nachgewiesen werden.

Bei den 50 isolierten MRSASA- Stämmen erwiesen sich 24 (48%) Stämme als SCC*mec*-Typ V, 2 (6%) Stämme als SCC*mec*-Typ III und 1 (2%) Stamm als SCC*mec*-Typ IVa. Nicht typisierbar waren 23 (46%) Stämme.

Von den 17 Betrieben, in denen MRSA-Keime sowohl bei Tieren als auch in Staubtupferproben nachweisbar waren, waren in 15 Betrieben die Kombination von *spa*- und SCC*mec*-Typen identisch.

Bei zehn Betrieben kamen MRSA-Keime bei den Tieren, den Staubtupferproben und auch den beprobten Personen vor. Bei fünf dieser Betriebe konnte dieselbe Kombination an *spa*- und SCC*mec*-Typ in Puten- und Staubtupferproben sowie Tupferproben von Personen nachgewiesen werden und bei drei dieser Betriebe stimmten dieselben Kombinationen von *spa*- und SCC*mec*-Typ in Puten- oder Staubtupferproben mit denen der Tupferproben von Personen überein.

Die Verteilungen der Staphylokokken-Stämme und deren *spa*-, SCC*mec*- und MLST-Typen auf die einzelnen Tiere und Personen der jeweiligen Betriebe sind in Tabelle 23 bis 42 aufgeführt. Die Tabellen 44 und 45 geben eine Zusammenfassung der *spa*- und SCC*mec*- Typisierungsergebnisse der MRS- Stämme an.

Tabelle 44: Ergebnisse der *spa*- und *SCCmec*-Typisierung der MRS-Stämme

t011, t1456, t2330, t002, t034 = *spa*-Typ t011, t1456, t2330, t002, t034

IVa, V, III = *SCCmec*-Typ IVa, V, III

n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

Die Anzahl der untersuchten Stämme stehen in Klammern. In Fettschrift gekennzeichnet sind die gleichen *spa*- und *SCCmec*-Typkombinationen, die innerhalb eines Betriebes aufgetreten sind.

Das Symbol # kennzeichnet das Auftreten der gleichen *spa*- und *SCCmec*-Typkombination bei MRSA-Stämmen von Tier- und Staubtupferproben, das Symbol ∇ kennzeichnet das Auftreten der gleichen *spa*- und *SCCmec*-Typkombination bei MRSA-Stämmen von Tier- oder Staubtupferproben und Tupferproben von Personen und das Symbol • kennzeichnet das Auftreten der gleichen *spa*- und *SCCmec*-Typkombination bei MRSA-Stämmen von Tieren- und Staub- und Personentupferproben in den jeweilig beprobten Betrieben.

Betrieb	1 • #		2 #		3 #		4		5	
	<b>MRSA (17)</b>	<b>MRSASA (4)</b>	<b>MRSA (21)</b>	<b>MRSASA (2)</b>	<b>MRSA (6)</b>	<b>MRSASA</b>	<b>MRSA (3)</b>	<b>MRSASA (2)</b>	<b>MRSA (1)</b>	<b>MRSASA (1)</b>
<b>Trachea</b>	<b>t011,V (8)</b>	V (1)	<b>t011,IVa (8)</b> t2330,V (1) t1456,V (1)	V (1)	<b>t002,n.t. (4)</b>					
<b>Kloake</b>	<b>t011,V (5)</b>	V (2) n.t. (1)	<b>t011,IVa (7)</b> t1456,IVa (1)	III (1)	<b>t002,n.t. (1)</b>			n.t. (2)		
<b>Staub</b>	<b>t011,V (1)</b>		<b>t011,IVa (1)</b>		<b>t002,n.t. (1)</b>					
<b>Personen</b>	<b>t011,V (3)</b>		t011,V (2)				t011,V (3)		t011,IVa (1)	V (1)

Betrieb	6 • #		7 • #		8 #		9 #		10 # ▽	
	MRSA (19)	MRSASA (2)	MRSA (17)	MRSASA (1)	MRSA (15)	MRSASA (11)	MRSA (18)	MRSASA (5)	MRSA (22)	MRSASA (1)
Trachea	t011,V (10)	V (2)	t011,IVa (8) t002,n.t. (2)		t1456,V (9)	V (4) n.t. (2)	t011,IVa (6) t002,n.t. (3)	n.t. (2)	t011,V (8) t002,n.t. (2)	
Kloake	t011,V (6)		t011,IVa (1) t002,n.t. (3)	n.t. (1)	t1456,V (5)	V (3) n.t. (1)	t011,IVa (3) t002,n.t. (2) t011,n.t. (1)	n.t. (3)	t011,V (9)	
Staub	t011,V (1)		t011,IVa (1)		t1456,V (1)		t002,n.t. (1)		t002,n.t. (1)	
Personen	t011,V (2)		t011,IVa (2)			IVa (1)	t034,V (1) t1456,V (1)		t011,V (1) t011,IVa (1)	III (1)

Betrieb	11 #		12		13 • #		14		15 • #	
	MRSA (8)	MRSASA (7)	MRSA (2)	MRSASA (1)	MRSA (23)	MRSASA (2)	MRSA (1)	MRSASA	MRSA (19)	MRSASA
Trachea	t011,IVa (5) t011,V (1)	n.t. (1) V (1)	t011,IVa (1)		t011,V (10)	n.t. (1)			t011,n.t. (6) t011,IVa (3)	
Kloake	t011,IVa (1)	n.t. (5)			t011,V (10)				t011,n.t. (7) t011,IVa (1)	
Staub	t011,V (1)		t011,V (1)		t011,V (1)	n.t. (1)	t011,IVa (1)		t011,IVa (1)	
Personen				n.t. (1)	t011,V (2)				t011,IVa (1)	

Betrieb	16		17		18		19		20	
	#		# ▽				#		# ▽	
	MRSA (7)	MRSASA (7)	MRSA (14)	MRSASA (1)	MRSA (13)	MRSASA	MRSA (19)	MRSASA	MRSA (22)	MRSASA (3)
Trachea	t011,V (3)	V (1)	t011,V (6) t034,V (1)		t011,V (4)		t011,V (4) t011,IVa (3) t011,n.t. (2)		t011,IVa (9) t011,V (1)	
Kloake	t011,V (3)	V (4)	t011,V (5)		t011,V (6) t011,IVa (1) t002,n.t. (1)		t011,V (5) t011,IVa (4)		t011,IVa (10)	V (2)
Staub	t011,V (1)		t034,V (1)		t011,n.t. (1)		t011,IVa (1)		t011,IVa (1)	
Personen		n.t. (2)	t011,V (1)	V (1)					t011,V (1)	n.t. (1)

Tabelle 45: Zusammenfassung der *spa*- und *SCCmec*-Typkombinationen der MRSA-Stämme

t011, t1456, t2330, t002, t034 = *spa*-Typ t011, t1456, t2330, t002, t034

IVa, V = *SCCmec*-Typ IVa, V

n.t. = nicht typisierbarer *SCCmec*-Typ

<b><i>Spa</i>- und <i>SCCmec</i>- Typkombination</b>	<b>Trachea</b>	<b>Kloake</b>	<b>Staub</b>	<b>Personen</b>	<b>Summe</b>
t011 / V	55	49	6	15	125 (46,8%)
t011 / IVa	43	28	6	5	82 (30,7%)
t011 / n.t.	8	8	1	0	17 (6,4%)
t002 / n.t.	11	7	3	0	21 (7,8%)
t1456 / V	10	5	1	1	17 (6,4%)
t1456 / IVa	0	1	0	0	1 (0,4%)
t034 / V	1	0	1	1	3 (1,1%)
t2330 / V	1	0	0	0	1 (0,4%)
Summe	129	98	18	22	267 (100%)



## 4.2 Ergebnisse VRE

### 4.2.1 Ergebnisse der Vorversuche zur Entwicklung der Real-Time PCR-Tests

#### Sequenz-Alignment mit Hilfe von NCBI-Sequenzdaten

Aus der NCBI-Datenbank wurden DNA-Sequenzen der *van*-Resistenzgene von VER bezogen. Anschließend wurden Abschnitte der DNA-Sequenzen ausgewählter Gene auf Übereinstimmungen verglichen (DNA-Alignments), um Bereiche einheitlicher DNA-Sequenzen für das Design von PCR-Primern zu ermitteln. Die verschiedenen *van*-Resistenzgene, die die Grundlage des Alignments darstellen, sind in der Tabelle 46 dargestellt und die Ergebnisse übereinstimmender Nukleotid-Sequenzen des Alignments sind im Anhang in den Diagrammen 11 bis 22 dargestellt.

Tabelle 46: Übersicht über die DNA-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank, die die Grundlagen für die Alignments bilden

<b>Resistenzgen</b>	<b>Accession No</b>	<b>Alignment</b>
<i>VanA</i>	EF206284	<i>vanA</i>
<i>VanA</i>	EF206285	
<i>VanA</i>	X56895	
<i>VanA</i>	EF206286	
<i>vanB (vanB1)</i>	U00456	<i>vanB1/2</i>
<i>vanB (vanB1)</i>	ENEVANB	
<i>vanB2</i>	AY145441	
<i>vanB2</i>	ENEVANB2A	
<i>vanC1</i>	EU151772	<i>vanC1</i>
<i>vanC1</i>	EU151771	
<i>vanC1</i>	EU151769	
<i>vanC1</i>	EU151770	
<i>vanC1</i>	EU151768	
<i>vanC2</i>	ECU94523	<i>vanC2/3</i>
<i>vanC2</i>	ECU94525	
<i>vanC2/3</i>	EU151762	
<i>Vanc2/3</i>	EU151764	
<i>vanC3</i>	AY033764	

### Primer-Design

Das Primer-Design wurde unter Anwendung des Programms Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) vorgenommen. Erste Tests zur Spezifität der entworfenen Primer erfolgten mittels sog. BLAST-Abfragen der NCBI-Datenbank. Zur Erzielung möglichst hoher Spezifitätswerte der PCR-Tests wurden jeweils Primerpaare für die einzelnen Resistenzgene ausgewählt, deren Nukleotid-Sequenzen eine möglichst große Abweichung zu Gensequenzen aufweisen, die nicht detektiert werden sollen.

### Abgleich des Alignment mit den Sequenzen der Sequenzierung der Referenzstämme und den Sequenzen der Primer

Mit Hilfe der klassischen PCR wurde jeweils ein Teilstück des *vanA*-Gen positiven Stammes BM 4147, des *vanB*-Gen (*vanB1*) positiven Stammes UAA 522, des *vanC1*-Gen positiven Stammes BM 4174 und des *vanC2/3*-Gen positiven Stammes ATCC 25788 vervielfältigt und eine DNA-Sequenzierung bei der Fa. Microsynth in Auftrag gegeben.

Anhand der Ergebnisse dieser Sequenzierungen konnte gezeigt werden, dass

- die DNA-Sequenzen der Alignments, die zum Primer-Design benutzt worden sind, mit denen der Referenzstämme identisch sind.
- die DNA-Sequenz der für die entwickelten SYBER Green Real-Time PCR-Methoden entworfenen und verwendeten Primer komplementär zu den Sequenzen der DNA-Sequenzierungen sind.

Die Nukleotid-Sequenzen der Alignments, der DNA-Sequenzierungen und der Primer sind im Anhang in den Diagrammen 11 bis 22 dargestellt.

### Validierung der Real-Time PCR

Zur Validierung der SYBR Green Real-Time PCR wurden *vanA*-, *vanB1*-, *vanB2*-, *vanB3*-, *vanC1*-, *vanC2*-Gen positive und *van*-Gen negative Enterokokken- und Streptokokken-Stämme in der Real-Time PCR getestet. Tabelle 47 stellt die verwendeten Enterokkoen-Stämme dar.

Alle *van*-Gen positiven Enterokokken-Stämme erwiesen sich in der Real-Time PCR als VRE-positive Stämme. Alle *van*-Gen negative Stämme erwiesen sich in der Real-Time PCR als VRE-negative Stämme.

Tabelle 47: Übersicht über die in dieser Arbeit für die Validierung der Real-Time PCR verwendeten Referenzstämme und Feldisolate

<b>Spezies</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Resistenzgen</b>
<i>Enterococcus faecium</i>	BM 4147	<i>vanA</i> -positiv
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	<i>vanB</i> -positiv ( <i>vanB1</i> )
<i>Enterococcus faecium</i>	UAA 522	<i>vanB</i> -positiv ( <i>vanB1</i> )
<i>Enterococcus faecium</i>	BM 4524	<i>vanB2</i> -positiv
<i>Enterococcus faecalis</i>	BM 45	<i>vanB3</i> -positiv
<i>Enterococcus gallinarum</i>	BM 4174	<i>vanC1</i> -positiv
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	ATCC 25788	<i>vanC2</i> -positiv
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	<i>van</i> -negativ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DSM 6784	<i>van</i> -negativ
<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidermicus</i>	Feldisolat CVUA Stuttgart 63VarJ1	<i>van</i> -negativ

## 4.2.2 Ergebnisse der Isolierung

Die Isolierung der VRE-Keime erfolgte in einem zweistufigen Verfahren bestehend aus einer Anreicherung und der Anzucht auf Selektivplatten. Die Auswertung der Selektivplatten wurde nach den Angaben der Herstellerfirma durchgeführt, dabei galten graue Kolonien mit schwarzem Präzipitationshof als VRE verdächtig. Insgesamt wurden auf 88 Selektivplatten VRE verdächtige Keime identifiziert.

## 4.2.3 Ergebnisse der Identifizierung

Von diesen auf 88 Selektivplatten als VRE verdächtig isolierten Keime konnten 77 Isolate bei der Identifizierung als Enterokokken bestätigt werden. Dabei wurden die Isolate als Enterokokken eingestuft, wenn sie bei 6,5% NaCl und 45°C wuchsen, eine positive Pyrrolidonyl-Peptidase und Leucin-Aminopeptidase Aktivität zeigten, ein positives Wachstum auf einem CATC -und Blut-Glucose-Äsculin-Galle-Agar zeigten und sich als bewegliche oder nicht bewegliche Keime in einem TTC- haltigen SIM-Medium erwiesen.

## 4.2.4 Ergebnisse der Charakterisierung der *van*-Resistenzgene

Die Auswertung der Real-Time PCR für den Nachweis der Resistgene von Enterokokken erfolgte in Abgleich mit Ergebnissen der entsprechenden Referenzstämme. Dies betrifft einerseits die mit den entsprechenden Referenzstämmen vergleichbaren Verläufe der Amplifikationskurven, als auch die in Tabelle 48 angegebenen Schmelztemperaturen der Schmelzkurven, deren Schwankungsbreite nach Angaben von Sting (2009) definiert wurden. Alle *van*-Gen positiven Referenzstämme erwiesen sich in der Real-Time PCR als positiv und alle *van*-Gen negativen Referenzstämme als negativ. Eine beispielhafte Darstellung der Schmelz- und Amplifikationskurven liefern die Diagramme 7 und 8.

Insgesamt wurden 68 Enterokokken-Isolate mit positiven *van*-Genen isoliert. Von diesen trugen zwölf Isolate das *vanA*-Gen (17,64%) und 56 Isolate das *vanC1*-Gen (82,35%). Die *vanB*- und *vanC2/3*-Gene konnten nicht nachgewiesen werden. Keines der Enterokokken-Isolate trug mehrere Resistenzgene gleichzeitig.

Tabelle 48: Schmelztemperaturen der Amplifikate der Real-Time PCR-Methoden für den VRE Nachweis

Resistenzgen	Schmelztemperatur (T <sub>m</sub> ) in ± 1 °C)
<i>vanA</i>	72,5
<i>VanB1/2/3</i>	78,0
<i>vanC1</i>	73,0
<i>vanC2/3</i>	76,0

Diagramm 7: Schmelzkurven der Real-Time PCR zum Nachweis des *vanA*-Resistenzgens von dem *vanA* positiven Referenzstamm BM 4147 (A), einem *vanA* positiven Feldisolat (B) und dem *vanA* negativen Referenzstamm DSM 2570 (NK). Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale (Derivative) im Verlauf einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung (Temperature (C)), sowie zusätzlich das Schmelzkurvenintervall zwischen 71,5 und 73,5 °C

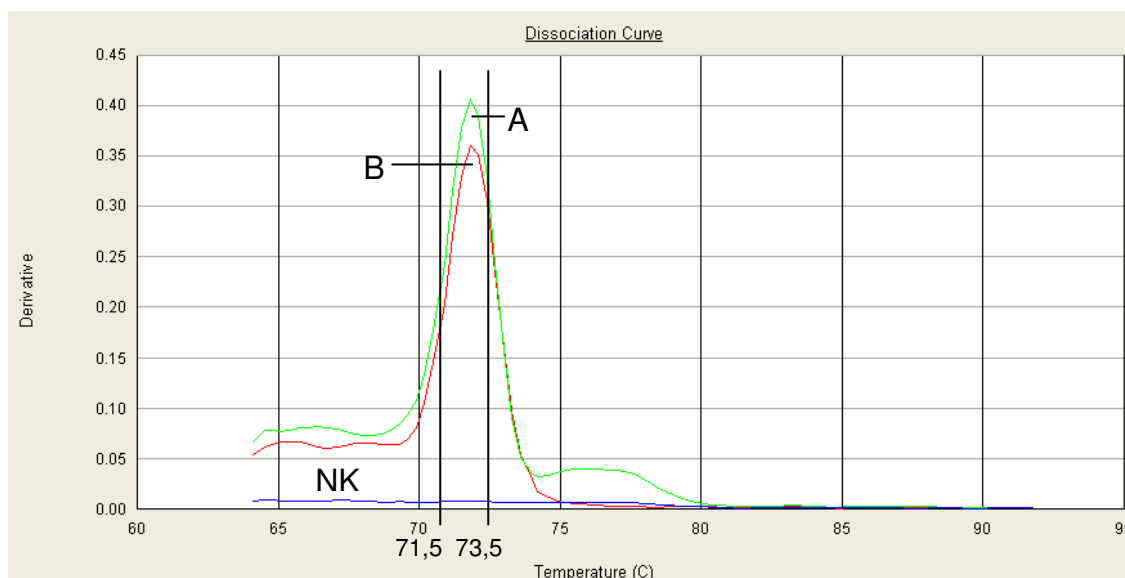
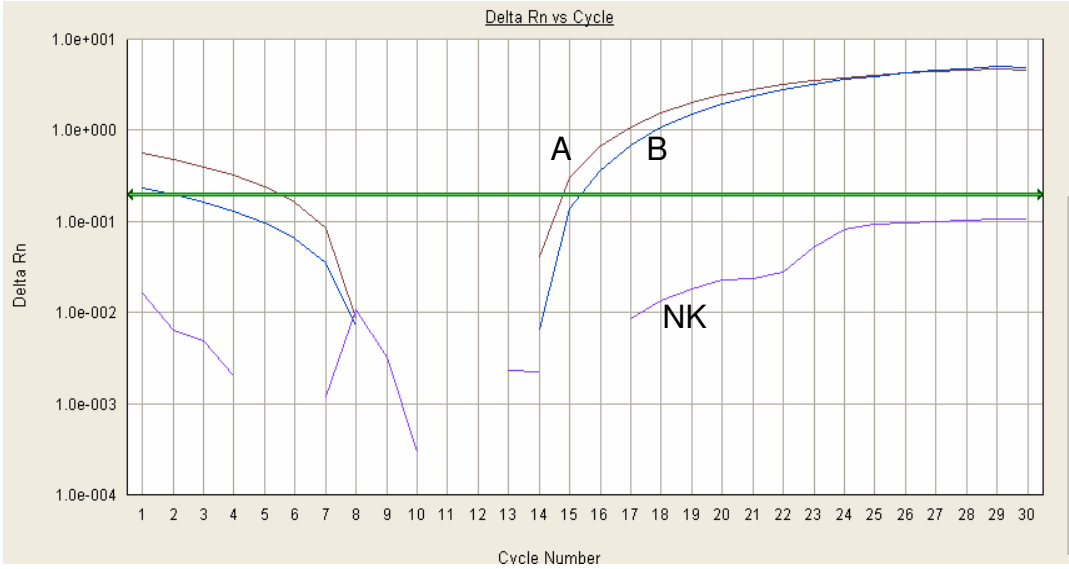


Diagramm 8: Amplifikationskurven der Real-Time PCR zum Nachweis des *vanA*-Resistenzgens von dem *vanA* positiven Referenzstamm BM 4147 (A), einem *vanA* positiven Feldisolat (B) und dem *vanA* negativen Referenzstamm DSM 2570 (NK). Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale (Delta Rn) im Verlauf der PCR-Zyklen (Cycler Number)



#### **4.2.5 Ergebnisse der Betriebe und der beprobten Personen**

Von den 20 beprobten Putenmastbetrieben wurden in 15 Betrieben VRE-Keime (75,0%) nachgewiesen, in fünf Betrieben hingegen nicht (25,0%). Hierbei gilt ein Betrieb als VRE-positiv, wenn mindestens eine Kloakentupferprobe eines Tieres oder die gepoolte Staubtupferprobe den Nachweis eines VRE-Isolates ergab. Von diesen 15 positiven Betrieben hatten neun Betriebe Hähne und sechs Betriebe Hennen eingestallt. Bei zehn Betrieben (Betrieb 2, 3, 5, 6, 8, 11, 13, 14, 15 und 19) waren sowohl die Staubtupferprobe als auch einige Kloakentupferproben VRE-positiv. Von diesen zehn Betrieben hatten sieben Betriebe Hähne und drei Betriebe Hennen eingestallt. In vier Betrieben (Betriebe 4 und 10 mit Hähnen, Betriebe 9 und 20 mit Hennen) waren nur die Staubtupferproben VRE-positiv, wohingegen im Betrieb 12 (Hennen) zwar acht der Kloakentupferproben, nicht aber die Staubtupferprobe VRE-positiv ausfiel. Somit ergab bei 93,3% der positiven Betriebe die Staubtupferprobe ein VRE-positives Ergebnis.

Von den insgesamt 200 beprobten Tieren waren 54 VRE-positiv (27,0%) und 146 VRE-negativ (73,0%). Im Durchschnitt erwiesen sich bei den elf Betrieben mit positiven Puten 4,9 von zehn beprobten Tieren als VRE-positiv (49,0%).

Jeweils drei auf den einzelnen Betrieben lebende Personen wurden mittels Nasentupfer auf VRE untersucht. Auf dem Betrieb 8 konnten nur zwei Personen untersucht werden. Bei allen 59 beprobten Personen konnten keine VRE-Keime aus den Nasentupferproben isoliert werden.

Die Tabelle 49 zeigt die VRE Ergebnisse der Kloakentupferproben der zehn Tiere, der Staubtupferprobe und der beprobten Personen der insgesamt 20 Betriebe.

Tabelle 49: Ergebnisse der Untersuchungen von Kloakentupferproben und der Staubtupferproben auf VRE-Keime in 20 Putenmastbetrieben

*vanA*, *vanC1* = Resistenzgene *vanA*, *vanC1*

Proben	Geschlecht	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8	Tier 9	Tier 10	Staub
<b>Betrieb 1</b>	männlich	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
<b>Betrieb 2</b>	männlich	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanA</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanA</i>
<b>Betrieb 3</b>	männlich	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>
<b>Betrieb 4</b>	männlich	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>
<b>Betrieb 5</b>	männlich	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>
<b>Betrieb 6</b>	männlich	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>
<b>Betrieb 7</b>	weiblich	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
<b>Betrieb 8</b>	männlich	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>
<b>Betrieb 9</b>	weiblich	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>
<b>Betrieb 10</b>	männlich	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>



<b>Proben</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Tier 1</b>	<b>Tier 2</b>	<b>Tier 3</b>	<b>Tier 4</b>	<b>Tier 5</b>	<b>Tier 6</b>	<b>Tier 7</b>	<b>Tier 8</b>	<b>Tier 9</b>	<b>Tier 10</b>	<b>Staub</b>
<b>Betrieb 11</b>	weiblich	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>
<b>Betrieb 12</b>	weiblich	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ
<b>Betrieb 13</b>	männlich	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>
<b>Betrieb 14</b>	männlich	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>
<b>Betrieb 15</b>	weiblich	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanC1</i>	<b>positiv</b> <i>vanA</i>
<b>Betrieb 16</b>	weiblich	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
<b>Betrieb 17</b>	weiblich	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
<b>Betrieb 18</b>	weiblich	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
<b>Betrieb 19</b>	weiblich	<b>positiv</b> <i>vanA</i>	<b>positiv</b> <i>vanA</i>	negativ	<b>positiv</b> <i>vanA</i>	<b>positiv</b> <i>vanA</i>	<b>positiv</b> <i>vanA</i>	<b>positiv</b> <i>vanA</i>	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanA</i>	<b>positiv</b> <i>vanA</i>
<b>Betrieb 20</b>	weiblich	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b> <i>vanA</i>

## 5 Diskussion

### 5.1. Diskussion des Nachweisverfahrens und der Ergebnisse von MRS bei Mastputen, in Mastputenställen und bei Personen

#### Probenentnahme für den MRS-Nachweis

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von Mastputen Tracheal- und Kloakentupferproben sowie Staubproben aus Putenställen für den Nachweis von Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRS) entnommen. Zusätzlich wurden Nasentupferproben von Personen untersucht. Die am häufigsten beprobte Körperregion für den Nachweis von MRSA-Keimen bei Säugetieren ist die Nasenschleimhaut (EFSA, 2009). Weitere beschriebene Entnahmestellen sind die Haut, das Perineum und das Rektum (EFSA, 2009). Sowohl beim Tier (Broiler) (Persoons et al., 2009) als auch beim Menschen (Baker et al., 2010) konnte gezeigt werden, dass MRSA-Keime mit vergleichbaren Ergebnissen in der Nase und extranasal gefunden werden konnten. In der Arbeit von Dullweber (2010) erwies sich die Untersuchung von Trachealtupferproben auf MRSA bei Masthähnchen als besonders geeignet.

In Anlehnung an das Zoonose-Monitoring bei Schweinen (EU-Zuchtschweine-Studie) (Anon, 2008a; BfR, 2009) wurden zusätzlich zu den Proben der Tiere, in den Putenställen fünf Staubtupferproben pro Stall entnommen, um einen vergleichenden Überblick über das Vorkommen von MRSA bei den Tieren und deren Stalleinheit zu erhalten.

#### Isolierung von MRS

Als Verfahren für den Nachweis von MRS wurde ein Vorgehen ausgewählt, das einerseits eine hohe Sensitivität gewährleistet und andererseits den Vergleich mit bereits durchgeführten Studien ermöglicht. Die Untersuchungen der Tracheal-, Kloaken-, Staub- und Humanproben auf MRS wurden deshalb gemäß den Angaben des Bundesinstituts für Risikobewertung, die im Rahmen des Zoonose-Monitorings bei Schweinen erstellt worden sind, durchgeführt (Anon, 2008a; BfR, 2009). Dieses Verfahren kombiniert eine Voranreicherung für Staphylokokken in einem nicht selektiven Medium mit anschließender Anreicherung für MRS-Keimen in einem mit Antibiotikum supplementierten selektiven Medium und abschließender Kultivierung auf einer selektiven chromogenen Agarplatte, die eine vorläufige Identifizierung von MRS-Keimen ermöglicht. Die Anwendung dieser standardisierten Methode hat sich sowohl für den Nachweis von MRS-Keimen in Umgebungsproben in Putenställen als auch für Proben direkt von Puten (Kloaken- und Tracheltupfer) bewährt, wie die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse der Tier- und Umweltproben zeigt.

Neben der Empfehlung der EFSA (EFSA, 2009) und des BfR (Anon, 2008a; BfR, 2009) kommen auch andere Autoren zu dem Schluss, dass diese Methode für den MRSA Nachweis am besten geeignet ist. So stellen Graveland et al. (2009) und Dullweber (2010) fest, dass ein Verfahren mit einer Voranreicherung bestehend aus einer Müller-Hinton-Bouillon mit Zusatz von 6,5% NaCl, einer anschließenden Anreicherung in einer mit Antibiotikum supplementierten Bouillon und abschließender Kultivierung auf einem MRSA-Selektivnährboden zu den besten Ergebnissen führt. Auch Otto-Kuhn et al. (2009) konnten MRSA-Keime mittels Anreicherungsverfahren und Anzucht auf dem MRSA-Ident-Agar der Firma Heipha nachweisen. Böcher et al. (2008) halten fest, dass eine Voranreicherung mit Zusatz von Kochsalz, Aztreonam und Cefoxitin bei einer starken Begleitflora eine hohe Sensitivität des Nachweises von MRSA-Keimen ermöglicht.

#### Nachweis des *mecA*-Resistenzgens von MRS

Der spezifische Nachweis des *mecA*-Resistenzgens von MRS mit Hilfe von PCR-Verfahren gilt allgemein als „Goldstandard“ (Grisold et al., 2002; Loo et al., 2003; Hope et al., 2004; Walther, 2007; Wellinghausen et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der molekularbiologische Nachweis von 317 *mecA*-Resistenzgen tragenden Isolaten mit Hilfe der Real-Time PCR unter Verwendung von SYBR Green. Damit wurde ein rasches und wenig arbeitsaufwendiges Verfahren angewandt. Die erfolgreich durchgeführte Validierung dieses PCR-Verfahrens unter Einbeziehung der Ergebnisse einer Multiplex-PCR (Poulsen et al., 2003) zeigt, dass diese Real-Time PCR-Technik ein geeignetes Verfahren für den Nachweis des *mecA*-Resistenzgens darstellt.

#### Identifizierung von MRS

In der vorliegenden Arbeit wurden von den 317 *mecA*-positiven Stämmen unter Verwendung der Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) 267 Stämme als *Staphylococcus aureus* (84,2%), 23 Stämme als *Staphylococcus haemolyticus* (7,3%), 15 Stämme als *Staphylococcus saprophyticus* (4,7%), sechs Stämme als *Staphylococcus epidermidis* (1,9%), vier Stämme als *Staphylococcus hyicus* (1,3%) und zwei Stämme als *Staphylococcus intermedius* (0,6%) identifiziert.

Die FT-IR ermöglicht eine zuverlässige, rasche und sichere Alternative zur oft schwierigen klassischen Identifizierung von Staphylokokken-Spezies (Naumann et al. 1990; Helm et al., 1991; Kirschner 2004; Horlacher und Rau, 2006; Rau et al., 2009; Kateete et al., 2010). Zudem wurde die Methode bereits erfolgreich bei der Identifizierung von MRSA-Keimen in Fleischproben angewendet (Otto-Kuhn et al., 2009).

### Typisierung von MRS

Die *mecA*-Gen tragenden Isolate wurden molekularbiologisch im Bundesinstitut für Risikobewertung mittels *spa*- (Shopsin et al., 1999), SCC*mec*-Typisierung (Zhang et al., 2005) und MLST-Typisierung (Enright et al., 2000) charakterisiert. Ziel dieser drei molekularbiologischen Typisierungsmethoden war es, Aussagen über eine mögliche Übereinstimmung der einzelnen Isolate treffen zu können.

Die niedrigen Kosten, die weniger komplizierten technischen Laborarbeiten im Vergleich zu anderen Methoden und die Möglichkeit der Typisierung von NT-MRSA, machen die *spa*-Typisierung zu einer einfachen, rasch durchführbaren und der derzeit besten Typisierungsmethode, die in dieser Arbeit bei allen *S. aureus*-Isolate durchgeführt wurde (Bens et al., 2006; Stommenger et al., 2006; Wewers et al., 2008; EFSA, 2009). Die unterschiedlichen Typen des *mecA*-Resistenzgens auf der chromosomalen Staphylokokken Genkassette (SCC*mec*) konnten sowohl bei MRSA als auch bei MRSASA mit der SCC*mec*-Typisierung abgefragt werden (Katayama et al., 2000; Zhang et al., 2009).

Die MLST Methode wurde in der vorliegenden Arbeit nur bei mindestens einem Isolat jedes identifizierten *spa*-Typs eingesetzt, da sie aufgrund der begrenzten Trennschärfe weniger für kurzfristige epidemiologische Analysen nützlich ist und wegen der notwendigen DNA-Sequenzierungen von sieben verschiedenen genomischen Loci sehr teuer ist (Cuny et al., 2010).

### Vorkommen von MRSA in den Mastputenbetrieben

Derzeit stehen keine Untersuchungsergebnisse zum Vorkommen von MRSA- und MRS-Keimen bei Mastputen zur Verfügung, so dass die Ergebnisse dieser Studie erstmals wichtige Daten liefern. In diesem Umfang nicht erwartet, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit das häufige Vorkommen von MRSA in Mastputenbeständen. So konnte zu einem hohen Anteil von 71,5% der untersuchten Puten in insgesamt 90% der Betriebe MRSA-Keime nachgewiesen werden. Erzielt wurden diese Ergebnisse durch Untersuchungen von Kloaken- und Trachealtupferproben, die von insgesamt 200 Mastputen stammen, sowie von je fünf gepoolten Staubtupferproben aus den 20 beprobten Mastputenstallungen.

Fetsch et al. (2009a) und Tenhagen et al. (2009) weisen darauf hin, dass das Vorkommen von MRSA-Isolaten aus Geflügelbeständen zwar beschrieben worden ist, aber derzeit weder umfassende Angaben zur Prävalenz von MRSA-Keimen beim Geflügel, noch zum Anteil betroffener Bestände vorhanden sind. Nach Einschätzung der EFSA (EFSA, 2009) wird das verbreitete Vorkommen des MRSA-Typs ST398 bei Puten in Europa als „eventuell“ auftretend eingestuft. Über das vereinzelte Vorkommen von MRSA bei Geflügel liegen Berichte vor. So beschreiben Nemati et al. (2008), dass zehn MRSA-Isolate (ST398) aus Nasen- und Kloakentupferproben von Mastelterntieren und Putenbroilern isoliert werden

konnten. In Belgien konnten ebenfalls aus Nasen- und Kloakentupferproben von Broilern MRSA-Keime isoliert werden. Betroffen waren acht von 75 untersuchten Tiere (Persoons et al., 2009). Dullweber (2010) konnte MRSA in deutschen Masthähnchenbetrieben nachweisen. Dabei erwiesen sich 70 von 270 Tracheal- und Staubproben (26%) aus 30 Masthähnchenbetrieben als MRSA-positiv. Vereinzelte Nachweise von MRSA bei Puten und Hühnern gelangen auch Hasman et al. (2010) und Fulhorst et al. (2010).

Darüber hinaus konnte der Nachweis von MRSA aus Hühner- und Putenfleisch geführt werden (Lee, 2003; Kwon et al., 2006; Otto-Kuhn et al., 2009). Mit 35,3% und 16,0% positiven Ergebnissen aus Puten- und Hähnchenfleisch, kommen in der Studie von de Boer et al. (2008) MRSA am häufigsten im Geflügelfleisch vor.

Umfassende Untersuchungen zu MRSA-Keimen wurden hingegen in Schweinebeständen durchgeführt. Auf der Grundlage eines EU-weiten Monitoringprogramms, das mindestens 80% der Zuchtschweinebetriebe erfasste, konnte gezeigt werden, dass in 41,8% der in Deutschland untersuchten Zuchtschweinebeständen MRSA-Keime in Staubpoolproben nachweisbar waren (Anon, 2008a; BfR, 2009). Auch andere Autoren konnten in Deutschland Nachweishäufigkeiten in Schweinebeständen mit 18%, 45% und 70% positiven Betrieben ermitteln (Meemken et al., 2008; Köck et al., 2009; Frick, 2010).

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Puten im Vergleich zu Schweinen mit einem vergleichbar hohen oder sogar noch höheren Vorkommen von MRSA-Keimen in Beständen zu rechnen ist.

#### Vorkommen von MRSA in verschiedenen Proben

In dieser Arbeit ergab bei allen Betrieben, die als MRSA-positiv eingestuft wurden, auch stets die Staubtupferprobe einen MRSA-positiven Nachweis. Damit kann eine Vereinfachung des Nachweises von MRSA-Keimen in Beständen bei Puten ebenso wie bereits bei Schweinen durch die Entnahme von Staubtupferproben erreicht werden. Auch Dullweber (2010) konnte in ihrer Arbeit bei deutschen Masthähnchen feststellen, dass sich Einzelstaubproben, besonders von der Tierwaage, für die Abschätzung der Herdenprävalenz eignen. Über eine erfolgreiche Anwendung von Staubtupferproben in Tierbeständen berichten ebenso Meemken und Blaha (2009) für Schweine- und Spohr et al. (2010) für Rinderbestände. Die Entnahme von Staubtupferproben stellt somit in Tierbeständen die Methode der Wahl für Monitoringuntersuchungen dar (EFSA, 2009).

Von den 143 MRSA-positiven Tieren der vorliegenden Studie erwiesen sich 84 Tiere sowohl in der Trachealtupferprobe als auch in der Kloakentupferprobe (58,7%), 45 Tiere nur in der Tracheltupferprobe (31,5%) und 14 Tiere nur in der Kloakentupferprobe (9,8%) als MRSA-positiv. Somit konnten von den MRSA-positiven Tieren 90,2% der Tiere über eine alleinige Trachealtupferprobenentnahme als MRSA-positiv identifiziert werden. Dies ermöglicht beim

Einzel tier den Nachweis von MRSA durch die ausschließliche Untersuchung einer Trachealtupferprobe.

Persoos et al. (2009) stellten dagegen fest, dass MRSA in gleicher Anzahl in Proben von Nasenlöchern und Kloaken bei Broilern gefunden werden kann. Im EFSA-Bericht zu MRSA (EFSA, 2009) wird auf vergleichende Studien eingegangen, bei denen durch zwei oder mehrere von verschiedenen Körperregionen bei Tieren entnommen Proben keine abschließende Aussage über eine gleichwertige Sensitivität des MRSA-Nachweises gemacht werden kann.

#### Beeinflussung der Tiergesundheit durch MRSA

Die Bedeutung von MRS-Keimen als Krankheitserreger in den untersuchten Putenmastbetrieben ist vernachlässigbar. So fielen in dem gesamten Zeitraum der Untersuchungen keine durch MRS bedingten klinischen Erscheinungen auf. Darüber hinaus wurden keine Abweichungen der Leistungsdaten (Mortaliätsrate, Durchschnittsgewicht, Futtermittelverwertung) festgestellt. Die wichtigste Kenngröße, die Mortalität, lag bei den Mastputenhähnen im Durchschnitt bei 10% und bei den Mastputenhennen bei 3,9%. Nach Angaben von Petermann (2006) zeigen „gute“ Mastdurchgänge durchschnittliche Verluste von 4-6% in der Hennen- und 8-10% in der Hahnenmast.

Über das Vorkommen von MRSA-Keimen bei gesunden Schweinen, Kälbern und Geflügel liegen Berichte zahlreicher Autoren vor (Huijsdens et al., 2006; Nemati et al., 2008; Khanna et al., 2008; Lewis et al., 2008; Pomba et al., 2009; Frick, 2010; Hasman et al., 2010; Spohr et al., 2010). Nach Fetsch et al. (2009a) und Tenhagen et al. (2008) treten solche sogenannten livestock-associated MRSA-Keime (LA-MRSA) bei Nutztieren weitgehend ohne klinische Erscheinungen auf. Fulhorst et al. (2010) und Popp (persönliche Mitteilung, 2010) schildern allerdings Einzelfälle von MRSA-Infektionen bei klinisch kranken Puten. Auch van Duijkeren et al. (2007) und Blaha et al. (2008) berichten von MRSA-Keimen, die aus pathologisch-anatomischen Veränderungen der Haut, der Gelenke, der serösen Häute, des Perikards und des ZNS von Schweinen stammen. Zudem gelang der Nachweis von MRSA bei Kühen mit Mastitiden und bei Pferden aus relevanten Infektlokalisationen (Devriese et al., 1972; Cuny et al., 2006; Cuny, 2008; Cuny et al., 2009; Spohr et al., 2010).

### Mögliche Gründe für die MRSA Belastung

Die Gründe für die hohe MRSA-Prävalenz in den untersuchten Mastputenbeständen können im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und müssen Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Ein möglicher Grund könnte der Zukauf MRSA-positiver Küken sein. *S. aureus*-Infektionen treten beim Wirtschaftsgeflügel bereits in Embryonen auf, mit der Folge erhöhter Embryosterblichkeit, sowie von Nabel- und Dottersackentzündungen. So ist neben der horizontalen Übertragung von Staphylokokken bei Geflügel auch deren vertikale Übertragung nachgewiesen (Hummel und Witte, 1978; Hafez und Jodas, 1997; Aarestrup et al., 1999; Selbitz, 2007).

Darüber hinaus kann eine Übertragung von Staphylokokken durch belebte und unbelebte Vektoren erfolgen (Hafez und Jodas, 1997; Selbitz, 2007).

Weitere MRSA-Quellen sind aufgrund der hohen Tenazität von *S. aureus* im Staub oder nach einem Mastdurchgang in Staubresten zu suchen (Gerlach, 2000; EFSA, 2009). So bringt Dullweber (2010) die vorgefundenen großen Unterschiede in der MRSA-Häufigkeit bei verschiedenen Masthähnchenbetrieben mit deutlichen Unterschieden im Reinigungs- und Desinfektions-Management in Zusammenhang. Zu der Fragestellung der Umweltbelastung mit Staphylokokken konnten Chapin et al. (2005) bei einer Luftmessung in einem leeren Schweinestall hochresistente KNS nachweisen, die für eine Kolonisierung der neu eingestellten Tiere verantwortlich sein könnten. Auch Kontaminationsquellen außerhalb der Putenstallungen wie Haus- (Schweine) oder Wildtiere (Vögel oder Nagetiere) müssen in Betracht gezogen werden. So diskutieren Spohr et al. (2010) die Übertragung von MRSA-Keimen von Schweinen auf Milchkühe, die auf dem selben Betrieb gehalten werden.

Unklar ist der Einfluss von Antibiotikabehandlungen auf das Vorkommen von MRSA-Keimen bei Tieren. In den für diese Arbeit untersuchten Betrieben wurden Antibiotika wie Enrofloxacin, Benzylpenicillin, Amoxicillin, Colistin, Oxytetracyclin, Neomycin und Tiamulin zur Behandlung von bakteriellbedingten Erkrankungen in unterschiedlichen Umfang eingesetzt. Es konnte jedoch nicht abschließend festgestellt werden, ob hier ein Zusammenhang zwischen dem Einsatz von Antibiotika und dem Auftreten von MRSA vorlag. So wurden auch in den zwei MRSA-negativen Betrieben während des beprobten Mastdurchgangs Antibiotika eingesetzt.

Auch Meemken und Blaha (2009) können aufgrund ihrer Untersuchungen nicht abschließend klären, ob das Vorkommen von MRSA bei Schweinen als Folge häufiger Antibiotikagaben und einem dadurch bedingten Selektionsdruck entsteht, oder ob das Zirkulieren von Stämmen einer klonalen Linie mit erworbener Multiresistenz vorherrscht. Nach Angaben von Tenhagen et al. (2009) ist der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von MRSA und dem Einsatz von antimikrobiellen Substanzen in der Tiermedizin umstritten, während diese Wechselwirkung in der Humanmedizin als gesichert gilt. Dennoch kann der Einsatz

antibiotischer Medikation zur Selektion auf natürliche Weise entstandener resistenter Varianten führen (Gonzales et al., 1997; Kayser, 1998; Pulz, 2009). Hinweis darauf gibt der Nachweis eines erhöhten Risikos des Vorkommens von MRSA-Keimen in Schweinebetrieben mit routinemäßigem Einsatz von Antibiotika im Vergleich zu Betrieben mit restriktiver Antibiotikaverabreichung (de Neeling et al., 2007; van Duijkeren et al., 2007, 2008). Auch Persoons et al. (2009) führen das Freisein von MRSA bei Legehennen im Vergleich zu den Broilern auf den geringen Antibiotikaeinsatz in der Legehennenhaltung zurück. Generell birgt der Einsatz von Antibiotika bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, die Gefahr einer zunehmenden Entwicklung, Selektion und Verbreitung von resistenten *S. aureus*-Klonen, die sich einem breiten Spektrum ökologischer Nischen als Reservoir anpassen können (EFSA, 2009). Einen Vorstoß eingeschränkter Anwendung von Antibiotika zur Verhinderung von Resistenzentwicklungen ist in Dänemark durch einen auf zwei Jahre befristeten Verzicht der Anwendung von Cephalosporinen bei Nutztieren gemacht worden (AHO, 2010).

#### Vorkommen von MRSASA in den Mastputenbetrieben

Zusätzlich zu MRSA-Keimen traten in elf Betrieben auch MRSASA-Keime (Methicillin-resistente Staphylokokken ausgenommen *S. aureus*) auf. In zehn Betrieben traten MRSASA jeweils nur bei den Tieren auf. In einem der Betriebe handelte es sich um MRSASA-Keime, die sowohl in der Staubtupfer- als auch in der Trachealtupferprobe einer Pute zu finden waren. In diesen elf MRSASA-positiven Betrieben erwiesen sich 36 Puten als Träger von MRSASA (18%). Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Mastputen nicht nur erheblich mit MRSA, sondern auch, wenn auch deutlich geringer, mit MRSASA-Keimen belastet sind.

Angaben über das allgemeine Vorkommen von MRSASA bei Geflügel gibt es insgesamt nur sehr wenige. Zum Vorkommen von Staphylokokken-Isolaten aus klinischen Proben von Puten und von Impfausrüstungen liegen Ergebnisse von Cortez de Jäckel et al. (2006) vor. Diese Autoren konnten 130 Staphylokokken-Isolate gewinnen, von denen sich 74 als KNS-Isolate erwiesen und 11,8% (n = 4) das *mecA*-Gen trugen.

Untersuchungen mit vergleichbarem Probenmaterial wie in der vorliegenden Arbeit, wurden bei Hühnern von Kawano et al. (1996) durchgeführt. Die Autoren erzielten Nachweisraten von MRKNS in drei Stallungen eines Betriebs in Japan, die abhängig vom untersuchten Stall von 2,2% über 8,6% bis zu 100% reichten. Untersucht wurden dazu Haut- und Nasentupferproben von 280 Tieren. PCR Untersuchungen auf das Vorhandensein des *mecA*-Gen erfolgte nur bei fünf der als MRKNS angesprochenen Isolate, die allerdings alle positive Ergebnisse lieferten. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte die Nachweisrate von



MRSASA bei den Puten eine weite Spanne, die von 0% bis 80% positiven Tieren pro Betrieb reichte.

Ebenso finden sich für andere Tierarten nur vereinzelte Angaben über den Nachweis von MRSASA-Keimen. So konnten MRSASA auch bei Schweinen, Pferden, Kühen, Hunden und Katzen nachgewiesen werden (Lilenbaum et al., 1998; Guardabassi et al., 2003; Schwarz et al., 2008; Spohr et al., 2010).

MRKNS können bei Tier und Mensch für klinische Infektionen verantwortlich sein (Guardabassi et al., 2003; Cortez de Jäckel et al., 2006; Schwarz et al., 2008). Darüber hinaus geht von MRKNS-Keimen eine potenzielle Gefahr der Übertragung des *mecA*-Gens auf Staphylokokken aus. Nach Enright et al. (2002) findet ein horizontaler Transfer von *mec*-Genen innerhalb von *S. aureus* relativ häufig statt. Hiramatsu et al. (2001) und Wu et al. (1996) sehen sogar den Ursprung des *mecA*-Gens in Koagulase-negativen Staphylokokken.

#### Vorkommen von MRSA und MRSASA bei den untersuchten Personen

Von den 59 im Rahmen dieser Arbeit mittels Nasentupferproben untersuchten Personen erwiesen sich 22 (37,3%) als Träger von MRSA und acht Personen (13,5%) als Träger von MRSASA. Betrachtet man den Nachweis von MRSA unter Berücksichtigung der Frequenz des Aufenthaltes in den Putenstallungen, so war die Chance (Verhältnis der Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis eintritt zur Wahrscheinlichkeit, dass das Ereignis nicht eintritt) (Bender und Lange, 2007) der Besiedlung mit MRSA bei Personen, die sich regelmäßig in Putenställen aufhielten, im Vergleich zu Personen, die sich nur selten oder nie in Putenställen aufhielten, deutlich erhöht (OR = 3,43). Die Ergebnisse decken sich mit denen aus Untersuchungen von Personen, deren MRSA-Nachweisrate mit dem Kontakt zu Schweinen positiv korrelierte.

So wiesen Personen, die mit Schweinen Kontakt hatten und MRSA-Prävalenzraten von 20% bis nahezu 40% auf und zeigen das erhöhte Risiko einer MRSA-Besiedlung beim Menschen im Zusammenhang mit MRSA-tragenden Tieren (Khanna et al., 2008; Meemken et al., 2008; Frick, 2010). Aber nicht nur Schweine kommen als MRSA-Quelle für Personen mit Tierkontakt in Frage, sondern auch Pferde (Weese et al., 2005; Cuny et al., 2006; Cuny, 2008; Walther et al., 2009) und Kühe (Hummel und Witte, 1979; Kaszanyitzky et al., 2007; Spohr et al., 2010).

Nicht nur Landwirte und deren Familien, sondern auch Tierärzte, Personen, die anderweitig in der Tierproduktion tätig sind und dabei direkten Kontakt zu Tieren haben, sowie Schlachthofpersonal müssen als Risikogruppe in Hinblick auf Besiedlungen und Infektionen mit MRSA eingestuft werden (Tenhagen et al., 2008; Fetsch et al., 2009a; EFSA, 2009). In einer Studie von Meemken et al. (2008) konnte bei Tierärzten in der Schweinepraxis mit 36% deutlich höhere Nachweisraten an MRSA ST398 erzielt werden als mit 14% bei Personen

mit weniger häufigem Kontakt (Personen der amtlichen Fleischuntersuchung). Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Studie, bei der die MRSA-Besiedlung auf einen regelmäßigen Kontakt zu MRSA-tragenden Nutztieren zurückzuführen ist. Andere Risikofaktoren wie Antibiotikabehandlung, Krankenhausaufenthalt oder eine Keimübertragung von Mensch zu Mensch spielen hierbei keine oder nur eine untergeordnete Rolle (Tenhagen et al., 2008; Cuny et al., 2010).

Tenhagen et al. (2008) weisen auf das Risiko einer Besiedlung mit MRSA-Keimen für Personen mit direktem Tierkontakt hin, welches mit steigender MRSA-Prävalenz in der Tierpopulation zunimmt. Somit muss auch bei Puten aufgrund des Zusammenhangs zwischen einer hohen Nachweisrate von MRSA in 90% der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Mastputenbetrieben und einer hohen Besiedlungsrate von 37,3% der zu diesen Betrieben assoziierten Personen der Kontakt zu Mastputen als ein bedeutender Risikofaktor für eine Besiedlung des Menschen mit MRSA Keimen beurteilt werden. Als Vergleich hierzu können Untersuchungen bei der gesunden Normalbevölkerung dienen, die mit 1,3% bis 2% nachweislich deutlich niedrigere Prävalenzraten für MRSA aufweisen (Salgado et al., 2003; Kenner, 2003).

Wenngleich sich in der vorliegenden Arbeit alle MRSA-tragenden Personen als symptomlose Träger erwiesen, besteht abhängig von der Virulenz der MRSA-Stämme für den Menschen insbesondere nach Gewebeverletzungen die Gefahr von Infektionen mit schweren lokal begrenzten, aber auch systemischen (Sepsis) fatalen Verläufen (Cuny et al., 2009). Auch bei Tieren sind MRSA-Infektionen mit eitrigen Entzündungen und klinischen Symptomen beschrieben (Van Duijkeren et al., 2007; Blaha et al., 2008; Fulhorst et al., 2010; Popp, 2010 persönliche Mitteilung). Hierbei stellt eine Kolonisation mit MRSA-Keimen das größte Risiko für eine Infektion dar (EFSA, 2009). Es sei an dieser Stelle deutlich darauf hingewiesen, dass MRSA-Keime aufgrund zahlreicher Virulenzfaktoren (Selbitz, 2007) und, wie aktuelle Untersuchungen zeigen, vermutlich auch genetischer Dispositionen (Ahn et al., 2010) in Verbindung mit einer stark reduzierten antibiotischen Therapierbarkeit fatale Infektionsverläufe vorgeben können. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Forderung, Personen, die Kontakt zu Tieren mit nachweislich hohen MRSA-Besiedlungsraten haben, vorsorglich vor einem Krankenhausaufenthalt auf MRSA zu testen und entsprechend zu behandeln (Cuny, 2008).

#### Verteilung der *spa*-, *SCCmec* und MLST-Typen bei den MRS-Isolaten

Ziel molekularbiologischer *spa*-, *SCCmec*- und MLST-Typisierungen war es, Aussagen über eine mögliche Übereinstimmung der einzelnen MRSA-Isolate von Tieren, Staub und Personen treffen zu können. Unter den 267 MRSA-Isolaten konnte am häufigsten mit einem Anteil von 83,9% der *spa*-Typ t011 nachgewiesen werden. Weitere *spa*-Typen wie t002 und

t1456 stellen mit Anteilen von 6-8% sowie die *spa*-Typen t034 und t2330 mit einem Vorkommen von maximal 1% einen vergleichsweise geringen Anteil der detektierten *spa*-Typen dar. Bei sieben Isolaten konnte der Sequenztyp ST398 (*spa*-Typen t011, t034, t1456 und t2330) und bei einem Isolat aus einer Trachealtupferprobe der Sequenztyp ST1791 (*spa*-Typ t002) bestimmt werden. Auch andere Autoren konnten den Sequenztyp ST398 mit den *spa*-Typen t011, t034 und t1456 bei Geflügelproben nachweisen (Nemati et al., 2008; Perssons et al., 2009; Dullweber, 2010; Fetsch et al., 2010). Der *spa*-Typ t002 konnte allerdings bisher nur in Kombination mit dem Sequenztyp ST005 bei Geflügel isoliert werden (Hasman et al., 2010; Fetsch et al., 2010) und kommt zudem als sogenannter „Rhein-Hessen“-Epidemiestamm als zweithäufigster haMRSA-Stamm in Deutschland vor (Epidemiologisches Bulletin, 2009). Auch der *spa*-Typ t2330 konnte bisher nicht in Proben von Puten, jedoch in Proben von Schweinen isoliert werden (Van den Broek et al., 2008). Zudem werden auch bei Schweinen und deren Kontaktpersonen überwiegend die *spa*-Typen t011 und t034 mit dem dazugehörigen Sequenztyp ST398 nachgewiesen (De Neelling, 2007; Khanna et al., 2008; Anon, 2008a; BfR, 2009; Köck et al., 2009; Frick, 2010).

Bei den *SCCmec*-Typen der MRSA-Isolate kam mit 54,7% der Typ V am häufigsten vor, gefolgt vom *SCCmec*-Typ IVa mit 31,1%. Ebenfalls beschrieben wird das Vorkommen der *SCCmec*-Typen V und IVa aus Proben von Geflügel und Geflügelfleisch (Nemati et al., 2008; Fetsch et al., 2009b; Dullweber, 2010). Der *SCCmec*-Typ III konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bei MRSA-, jedoch bei MRSASA-Isolaten nachgewiesen werden. Andere Autoren dagegen konnten auch den *SCCmec*-Typ III bei MRSA-Isolaten von Geflügel isolieren (Lee et al., 2003; Kwon et al., 2006; Nemati et al., 2008).

Ein Hinweis auf eine horizontale Übertragung der MRSA-Isolate zwischen dem Stallstaub und den Puten gibt der Vergleich der Ergebnisse der *spa*- und *SCCmec*-Typkombinationen der MRSA-Isolate, die von Tieren gewonnen worden sind, mit denen der Staubproben. Dabei zeigt sich eine Übereinstimmung von 88,2% (15 von 17 Betrieben). Auffallend ist, dass die Vielfalt unterschiedlicher Typen im Gegensatz zu einem generellen Vorkommen von MRSA-Keimen in einem Bestand nur durch die Beprobung von Einzeltieren und nicht mittels ausschließlicher Staubpoolprobenentnahme erfasst werden kann.

Bei den beprobten Personen konnte in der vorliegenden Arbeit überwiegend der *spa*-Typ t011, jedoch in jeweils nur einem Fall die *spa*-Typen t1456 und t034 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse spiegeln zum einen das dominante Vorkommen des Typs t011 in den Putenmastställen wider und decken sich mit Ergebnissen anderer Studien, in denen bei Personen mit Kontakt zu landwirtschaftlichen Nutztieren ebenfalls der Nachweis der *spa*-Typen t011 und t034 gelang, die als livestock-associated MRSA (laMRSA) bezeichnet und dem Sequenztyp ST398 zugeordnet werden (Khanna et al., 2008; Cuny et al., 2008; Frick, 2010). Der als typischer „Geflügel-*spa*-Typ“ angesehene und bislang noch nicht beim

Menschen isolierte Typ t1456 (Perssons et al., 2009) wurde in dieser Studie erstmals bei einer Person isoliert, allerdings nicht in den Tier- und Staubproben des betreuten Betriebs. Insgesamt lässt die hohe Übereinstimmung von *spa*- und *SCCmec*-Typkombinationen bei Puten- und/oder Staub- sowie Personentupferproben (acht von zehn Betrieben) auf eine wechselseitige Übertragung von MRSA-Keimen schließen und betont somit das zoonotische Potential von laMRSA-Keimen, nicht nur der bisher untersuchten landwirtschaftlichen Tiere (Khanna et al., 2008; Köck et al. 2009; Frick, 2010; Spohr et al., 2010), sondern auch der von Puten stammenden MRSA-Keime.

## 5.2 Diskussion des Nachweisverfahrens und der Ergebnisse von VRE bei Mastputen, in Mastputenställen und bei Personen

### Nachweisverfahren von VRE

Für den Nachweis von VRE-Keimen aus Kloakentupferproben von lebenden Puten und Staubtupferproben aus Putenställen sowie humanen Nasentupferproben hat sich die von Ellerbroek et al. (2004) beschriebene Methode bewährt, die ein Anreicherungsverfahren mit anschließender Kultivierung auf Selektivagar kombiniert. Dieser Methodik entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit eine Chromocult®-Enterokokken-Bouillon zur VRE-Anreicherung und ein mit Vancomycin supplimentierter Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar eingesetzt. Abweichend von den Angaben von Ellerbroek et al. (2004) diente aufgrund von Produktionsumstellungen der Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar als gleichwertiger Ersatz für den von diesen Autoren verwendeten CATC-Agar.

Eine dem direkten Ausstrich auf Agarmedium vorangestellte Anreicherung wurde gewählt, weil das direkte Ausstreichen von Tupferproben auf einem Selektivnährmedium bei Untersuchungen von Schweinen und Geflügel als zu wenig sensitiv beschrieben wurde (Butaye et al., 1999a, b). Die Supplementierung des Selektivnährbodens erfolgte mit einer geringen Konzentration von 6µg/ml Vancomycin, um sowohl den Nachweis von Enterokokken mit „low-level-“ (*vanC*) als auch „high-level-“ (*vanA*, *vanB*) Resistenzgenen zu ermöglichen (Butaye et al., 1999a, b). Richter (1999) hingegen isolierte bei Mastgeflügel nur „high-level“ *vanA*-Resistenzgene tragende VRE Keime mit einer vergleichsweise hohen Vancomycin-Konzentration von 50mg/l. In der vorliegenden Arbeit wurden darüber hinaus die Agarplatten nicht nur einen Tag, sondern zwei Tage bebrütet, was nach Angaben von Butaye et al. (1999a, b) eine signifikant höhere Nachweisempfindlichkeit von VRE-Keimen ermöglicht. Bisherige Studien erzielten mit der angewandten Methodik bei Untersuchungen nicht nur von Kloakentupferproben von Geflügel, sondern auch bei Proben von frisch geschlachteten Rindern, Schweinen, Geflügel und von Lebensmitteln gute Ergebnisse (Butaye et al., 1999a, b; Peters, 2003; Ellerbroek et al., 2004).

Die Identifizierung der Enterokokken erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe biochemischer Parameter nach Angaben von Ruoff et al. (2003) und Ellerbroek et al. (2004). Die Auswahl von insgesamt sieben Parametern ermöglicht eine sichere Bestimmung der Gattung *Enterococcus*.

Eine differenzierte Aussage über das Vorliegen von Resistenzgenen bei Enterokokken und somit das Vorliegen von VRE-Keimen ist nur durch den Nachweis der Resistenzgene möglich (Werner et al., 2008a). Der Nachweis der *vanA*-, *vanB1/2/3*-, *vanC1*- und *vanC2/3*-Gene konnte schnell und zuverlässig mittels Real-Time PCR unter Verwendung von SYBR

Green durchgeführt werden. Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung als Überprüfung der Real-Time PCR-Methode konnte gezeigt werden, dass die Resistenzgene *vanA*, *vanB1/2/3*, *vanC1* und *vanC2/3* zuverlässig detektiert werden konnten. In dieser Arbeit wurden die zuvor genannten Resistenzgene einbezogen, da diese bei Tier und Mensch als die am häufigsten vorkommenden beschrieben worden sind (Richter, 1999; Lemcke und Bülte, 2000; Borgen et al., 2001; Khan et al., 2002; Lemcke, 2003; Ellerbroek et al., 2004; Seo et al., 2005). Darüber hinaus erfüllt die Real-Time PCR die Anforderung, sowohl zahlreiche Resistenzgene rasch mit wenig Arbeitsaufwand detektieren zu können, als auch für Untersuchungen großer Probenzahlen anwendbar zu sein. So war es im Gegensatz zu anderen Studien möglich (Richter, 1999; Butaye et al. 1999a, b), sich nicht auf den Nachweis nur weniger Resistenzgene beschränken und nicht ausschließlich aufgrund des Wachstums auf Selektivagar auf VRE-Keime schließen zu müssen.

#### Vorkommen von VRE in den Mastputenbetrieben

Von 200 beprobten Puten aus 20 Betrieben erwiesen sich 54 Tiere als VRE-positiv (27%) und 146 als VRE-negativ (73%). Damit waren 75% der untersuchten Putenmastbetriebe mit mindestens einem VRE-positiven Ergebnis betroffen (Proben von Puten oder Staub).

Auch andere Studien erzielten vergleichbare Ergebnisse und belegen übereinstimmend, dass VRE-Keime in der Geflügelmast sehr weit verbreitet sind (Richter, 1999; Butaye et al., 1999a, b; Borgen et al., 2001). So konnte beispielsweise Richter (1999) in Ihrer Arbeit in insgesamt elf Masthähnchenherden, die auf ökologischen und konventionellen Betrieben standen, VRE-Keime nachweisen. Von insgesamt 223 an unterschiedlichen Lokalisationen im Stall, beim Transport, im Schlachthof und von Tieren entnommenen Proben ergaben 134 positive Ergebnisse (60,1%). In Belgien konnten mittels Kloakentupferproben festgestellt werden, dass junge Broiler im Alter von zwei und fünf Wochen zu 95%, gleichaltrige junge Legehennenküken hingegen nur zu 12,5% mit VRE-Keimen besiedelt waren. Bei über zehn Wochen alten Legehennen waren VRE-Keime sogar nicht mehr nachweisbar (Butaye et al., 1999). Im Rahmen einer norwegischen Studie wird mit 81% über ebenfalls hohe VRE-Nachweisraten bei Schlachtkörpern von Broilern und Puten ( $n = 100$ ) und mit 18% bei Schlachtkörpern von Legehennen ( $n = 50$ ) berichtet. Jeder Schlachtkörper stammte von einem anderen Betrieb, so dass insgesamt 150 verschiedene Betriebe beprobt werden konnten. Hierbei erwiesen sich 81% der Betriebe als positiv (Borgen et al., 2001).

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Hinblick auf die Intraherdenprävalenz von VRE, ergeben sich sehr unterschiedliche Werte. So konnte im Durchschnitt bei 4,9 Puten pro Herde VRE-Keime isoliert werden, wobei bei der Hälfte der Herden sechs bis neun Puten und bei der anderen Hälfte nur ein bis drei Tiere VRE-positiv waren. Zu einer ebenso großen Varianz der Intraherdenprävalenz gelangt eine andere

Studie, bei der frische Caecumproben bei 60 Broilern aus drei Betrieben am Schlachthof entnommen und auf VRE untersucht wurden. Im Betrieb A waren im Durchschnitt 70% der untersuchten Tiere, im Betrieb B 55% und im Betrieb C 0% der Tiere VRE-positiv (Nilsson et al., 2009). Anhand dieser Ergebnisse verwundert es nicht, dass das Vorkommen von VRE bei Geflügelfleisch eine genauso große Rolle wie bei lebenden Tieren spielt (Lemcke, 2003; Ellerbroek et al., 2004).

Der Untersuchung von Staubtupferproben kommt in der vorliegenden Arbeit besondere Bedeutung zu, da bei 93,3% der VRE-positiven Betriebe diese VRE-positiven Ergebnisse erzielt wurden. Auch in anderen Studien konnte der Nachweis von VRE-Keimen bei Masthähnchen mit hoher Sicherheit durch Proben aus der Umgebung der Tiere im Stall (Sockentupfer vom Boden, Tupfer von den Zu- und Ablufteinrichtungen, Tupfer von den Wasser- und Futterleitungen) geführt werden (Richter, 1999; Nilsson et al., 2009).

Aufgrund dieser Ergebnisse können für umfangreiche Screening- und Monitoringuntersuchungen zum Vorkommen von VRE-Keimen bei Mastputen gepoolte Staubproben, vergleichbar dem Nachweis von MRSA-Keimen, als Mittel der Wahl angesehen werden.

Die Bedeutung von VRE-Keimen als Krankheitserreger in den untersuchten Putenmastbetrieben ist, ebenso wie bei MRSA, vernachlässigbar. In dem gesamten Zeitraum der Untersuchungen fielen keine durch VRE-bedingte klinischen Erscheinungen bei den Mastputen auf. Zudem erwiesen die wichtigsten Leistungsdaten (Mortalitätsrate, Durchschnittsgewicht, Futtermittelverwertung) Normalwerte auf.

### Mögliche Gründe für die VRE Belastung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in Putenbeständen mit einem erheblichen Vorkommen von VRE-Keimen zu rechnen ist. Auf der Grundlage dieser wichtigen Erkenntnis muss es Ziel weiterführender Untersuchungen sein, die Gründe hierfür zu eruieren. In der Literatur werden mehrere Gründe für einen VRE-Eintrag und eine hohe VRE-Belastung beim Geflügel diskutiert. Neben dem Verbleib von VRE Keimen im Stall trotz Leerung und Reinigung der Stallungen erschwert das Vorkommen und die Überlebensfähigkeit von VRE-Keimen über Wochen und Monate in der Umwelt deren Elimination (Simon et al., 2004; Chapin et al., 2005; Nilsson et al., 2009).

Des Weiteren sind für die Verbreitung von VRE in Mastputenbeständen mit diesen Keimen belastete Bruteier in Betracht zu ziehen (Richter, 1999). Auch belebte und unbelebte Vektoren sollten als sekundär kontaminierende Faktoren nicht außer Acht gelassen werden. Nicht nur kontaminiertes Futter, Trinkwasser und Nagetiere (Hafez und Jodas, 1997), sondern auch Arbeitsgeräte und Stallinventar (Richter, 1999) können als Vektoren von Enterokokken in Frage kommen.

Als weitere Ursache für die hohe VRE-Prävalenz in den untersuchten Mastputenherden ist der Selektionsdruck durch den Einsatz von Antibiotika anzusehen. So standen alle im Rahmen dieser Studie untersuchten Mastputen während ihrer Mast mindestens einmal unter Antibiotikatherapie. Für die Therapie von bakteriell bedingten Erkrankungen kamen hierfür Antibiotika wie Enrofloxacin, Benzylpenicillin, Amoxicillin, Colistin, Oxytetracyclin, Neomycin und Tiamulin zum Einsatz. Da aber auch die VRE-negativen Betriebe während des beprobten Mastdurchgang mindestens einmal eine Antibiotikatherapie durchführten, kann nicht abschließend festgestellt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Einsatz von Antibiotika und dem Auftreten von VRE gibt.

Es ist bekannt, dass Antibiotika Mutationen, die zur Resistenzbildung eines Isolates führen, nicht auslösen, sondern bereits vorhandene oder spontan aufgetretene resistente Bakterien selektieren (Simon et al., 2004). So wird der höhere Anteil VRE-positiver Proben aus der konventionellen Geflügelmast im Vergleich zu Proben aus kleinbäuerlichen, ökologischen Haltungsformen auf den Einsatz von Antibiotika zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken zurückgeführt (Richter, 1999; Lemcke, 2003). Besonders in den Blickwinkel der Resistenzproblematik bei VRE ist der Einsatz des Antibiotikums Avoparcin geraten, das bis 1995 als Leistungsförderer in der Tiermast Anwendung fand. Avoparcin steht im Verdacht, zur Entwicklung von Kreuzresistenzen bei Enterokokken gegen die derzeit in der Humanmedizin angewendeten Glykopeptid-Antibiotika Vancomycin und Teicoplanin geführt zu haben. Tierbestände gelten deswegen als potenzielles Reservoir für Glykopeptid-resistente Enterokokken (Klare et al., 1995a, b; Bager et al., 1997). Untersuchungen im Jahr 1996 haben gezeigt, dass sich das Verbot von Avoparcin noch nicht nachhaltig auf eine



Reduzierung des Vorkommens von VRE-Stämmen ausgewirkt hat. So konnten Lemcke (2003) und Richter (1999) auch noch Jahre nach dem Verbot von Avoparcin als Futtermittelzusatzstoff in Deutschland VRE-Keime bei lebendem Geflügel sowie in Schweine- und Geflügelfleisch nachweisen. Selbst in kleinbäuerlichen, ökologischen Betrieben, die kein Avoparcin einsetzten, konnten VRE-Keime isoliert werden (Richter, 1999). Eine spätere, im Jahr 2003 durchgeführte Studie, die bei Rindern und Schweinen und von diesen Tierarten gewonnenen Lebensmitteln durchgeführt worden ist, ergab hingegen keine Hinweise auf das Vorkommen von Glykopeptid-resistente Enterokokken. Außerdem waren bei Mastschweinen Glycopeptidresistenzen nur in einem geringen Umfang von 9% der untersuchten *E. faecium*-Isolate (n = 35) nachweisbar. Der Autor bringt diese positive Entwicklung mit dem Verbot der Anwendung von Avoparcin in Zusammenhang (Peters, 2003).

Ein gegensätzliches Bild zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, die 14 Jahre nach dem Verbot der Anwendung von Avoparcin VRE in 75% der untersuchten Mastputenbestände aufdeckt.

#### Verteilung der einzelnen *van*-Gene

Das Spektrum nachweisbarer Resistenzgene beschränkt sich in der vorliegenden Studie ausschließlich auf das *vanA*-Gen (17,6%) und das *vanC1*-Gen (82,4%) der insgesamt 68 isolierten VRE-Keime. Nicht nachgewiesen werden konnten die in die Untersuchungen einbezogenen Resistenzgene *vanB1/2/3* und *vanC2/3*. Keines der Enterokokken-Isolate trug mehrere Resistenzgene gleichzeitig.

Auch in anderen Studien wurden in Geflügelfleischproben und Kotproben von Hühnern und Puten Enterokokken überwiegend mit den Resistenzgenen *vanA* und *vanC1* isoliert. Einige Autoren konnten jedoch darüber hinaus vereinzelt die Resistenzgene *vanC2* und *vanC3* isolieren (Lemcke und Bülte, 2000; Borgen et al., 2001; Khan et al., 2002; Lemcke, 2003; Ellerbroek et al., 2004, Seo et al., 2005). Einen Überblick über das Vorkommen von Resistenzgenen bei VRE-Keimen geben Untersuchungen von Halshäuten und Blinddärmen frisch geschlachteter Geflügel, Schweine- und Geflügelfleischproben sowie von Umwelt- und Kotproben von Hühnern und Puten. Hierbei konnte das *vanA*-Gen bei 17,3% bis 48,1%, das *vanC1*-Gen bei 9,0% bis 51,8% und das *vanC2*-Gen bei 2,1% bis 30,9% der Proben nachgewiesen werden (Richter, 1999; Borgen et al., 2001; Khan et al., 2002; Lemcke, 2003; Ellerbroek et al., 2004). Nur ein Isolat aus Schweine- und Geflügelfleischproben trug gleichzeitig das *vanA*- und das *vanC1*-Gen (Lemcke, 2003). Insgesamt kaum nachweisbar ist das *vanB*-Gen. Während Lemcke (2003) das *vanB*-Gen nicht nachweisen konnten und Ellerbroek et al. (2004) und Woodford (1995) feststellen, dass *vanB*-Gen tragende VRE-

Keime nur bei Humanisolaten vorkommen, gelangen Portillo et al. (2003) der Nachweis dieses Resistenzgens bei einem Isolat aus einer Schweinekotprobe.

#### Vorkommen von VRE bei den untersuchten Personen

Obwohl in 14 Betrieben VRE Keime in der Staubprobe nachweisbar waren und 39 Personen sich regelmäßig im Putenstall aufhielten, konnten bei keiner der 59 beprobten Personen VRE-Keime in Nasentupferproben isoliert werden. Somit kam es im Gegensatz zu MRSA trotz starker Exposition gegenüber VRE-kontaminiertem Staub zu keiner Besiedlung der Nasenschleimhaut und einer Übertragung von VRE-Keimen über Staub auf Personen kommt kaum Bedeutung zu. In wie weit VRE-tragende Puten als Quelle für eine Besiedlung von Menschen in Frage kommen, muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden. Zu bedenken ist jedenfalls, dass die Bedeutung von VRE in der Humanmedizin seit dem ersten Nachweis 1988 immer mehr zunimmt. So nahmen VRE-Keime im Jahr 2008 in Deutschland den dritten Platz hinter MRSA und ESBL (extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae) der nosokomialen, multiresistenten Infektionserreger ein (Uttley et al., 1988; Heudorf und Tessman, 2008). In Europa können sogar VRE-Keime bei gesunden Personen außerhalb von Krankenhäusern isoliert werden (Klare et al., 1995a; Bates, 1997). In der Humanmedizin werden VRE vor allem in Urin, Wundabstrichen, Stuhlproben, Bronchialsekreten, Blut und dem Atemtrakt (Sputum) nachgewiesen (Heudorf und Tessmann, 2008). Als primäres Habitat für VRE beim Menschen gilt der Gastrointestinaltrakt, besonders der Dickdarm, so dass diese Keime in hohen Konzentrationen im Stuhl vorkommen und das Umfeld kontaminieren können (Simon et al., 2004). Dadurch kann es zu Infektionen von Wunden, Besiedlung der Hände, der Haut und Infektionen aufgrund von Instillationen mittels Sonden sowie Gefäß- oder Harnwegskathetern kommen.

Ob eine Übertragung von VRE von Tieren auf den Menschen sowohl durch direkten Kontakt als auch durch tierische Lebensmittel stattfinden kann und somit eine Zoonose vorliegt, wird insgesamt in der Literatur sehr unterschiedlich diskutiert. Nach Ellerbroek et al. (2004) kann generell eine Übertragung resistenter Mikroorganismen von Tieren auf den Menschen sowohl durch direkten Kontakt als auch durch tierische Lebensmittel stattfinden. Vor allem in der Humanmedizin geht man davon aus, dass VRE in Europa über kontaminierte Lebensmittel tierischen Ursprungs auf den Menschen übertragen wurde und somit den Weg in Krankenhäuser gefunden hat (Klare et al., 1995 a, b; Bager et al., 1997; Simon et al., 2004). Nach Angaben von Cetinkaya et al. (2000) ist aber noch kein schlüssiger Beweis für eine Übertragung von VRE über tierische Lebensmittel auf den Menschen geführt worden, obwohl in der Literatur Studien zum Nachweis von VRE in Fleisch zu finden sind (Lemcke, 2003; Ellerbroek et al., 2004). Unklar stellt sich die Situation auch deshalb dar, da einerseits

sehr ähnliche VRE-Stämme sowohl bei Geflügel und Schweinen als auch bei deren Haltern und aus dem humanmedizinisch-klinischen Bereich gefunden worden sind (Stobberingh et al., 1999; Descheemaeker et al., 1999; Simonsen et al., 1998; Johnsen et al., 2005), andererseits aber VRE-Isolate aus der Tierhaltung und von Lebensmitteln tierischen Ursprungs deutlich von VRE-Isolaten aus dem humanmedizinisch-klinischen Bereich abgrenzbar sind (Descheemaeker et al., 1997, 1999; Lemcke, 2003; Perri et al., 2003; Kolar et al., 2005; Seo et al., 2005; Kotzamanidis et al., 2009; Sahlstrom et al., 2009). Es ist sehr schwierig, eine genetisch-epidemiologische Beziehung zwischen Isolaten verschiedenen Ursprungs herzustellen. Dies zeigen Untersuchungen, bei denen VREF- (Vancomycin-resistente *E. faecium*) Isolate von nicht hospitalisierten Patienten und VREF-Isolate von Schweinen sowie von hospitalisierten Patienten, Kälbern, Katzen und Hunden der gleichen Genogruppe zugeordnet werden konnten. Dagegen bildeten Hühner- und Puten-Isolate nicht mit VREF-Humanisolaten eine Genogruppe (Willems et al., 2000; Lemcke, 2003).

Die vorliegende Arbeit zeigt ein häufiges Vorkommen von VRE bei Mastputen und im Staub der Stallungen. Um Übertragungswege zu erforschen, sollten im Rahmen von Folgeuntersuchungen weitere Körperregionen (Darmtrakt) von stark und wenig exponierten Personen beprobt werden und humane VRE-Isolate mit denen von Puten verglichen werden.

## 6 Schlussfolgerung

### MRSA

- Für den Nachweis von MRSA bei Puten, Personen und Stallstaub hat sich die bereits im Rahmen des Zoonose-Monitorings bei Schweinen bewährte Methode (Anon, 2008a; BfR, 2009) ebenfalls als erfolgreich erwiesen.
- Für die Bestimmung der Herdenprävalenz von MRSA bei Mastputen hat sich die Entnahme von Staubproben repräsentativer Lokalisation in den Mastputenställen und deren Zusammenfassung zu Poolproben als ein geeignetes Verfahren bewährt.
- Um jedoch einen Überblick über das Vorkommen von MRSA-Typen innerhalb eines Bestandes zu bekommen, ist die im Vergleich zur Staubprobenentnahme aufwändigere stichprobenartige Entnahme von Trachealtupferproben notwendig.
- Durch diese Studie konnten erstmals umfassende Daten zum Vorkommen von MRSA bei Mastputen gewonnen werden. Die Nachweisraten fielen hierbei mit 71,5% positiven Mastputen in 90% der untersuchten Mastputenbetriebe unerwartet hoch aus.
- Das zoonotische Potenzial von MRSA wird in folgenden Ergebnissen deutlich:
  - Personen mit Kontakt zu Mastputen erwiesen sich weit häufiger MRSA-positiv als Personen aus der Normalbevölkerung.
  - Die Chance der Besiedlung mit MRSA ist bei Personen, die sich regelmäßig in Putenställen aufhielten, im Vergleich zu Personen, die sich nur selten oder nie in Putenställen aufhielten, deutlich erhöht (OR = 3,43).
  - Bei den beprobten Personen wurden ausschließlich und bei den beprobten Puten überwiegend MRSA-Typen isoliert, die dem bereits bekannten Sequenztyp ST398 livestock-associated MRSA (laMRSA) zugeordnet werden konnten.
- Nicht nur Personen mit Kontakt zu Schweinen, sondern auch Personen mit Kontakt zu Puten sollten vor einem Aufenthalt in einer medizinischen Einrichtung auf eine Besiedlung mit MRSA getestet werden. Empfehlungen hierzu hat das Robert Koch-Institut bereits für Personen mit Kontakt zu Schweinen veröffentlicht (Epidemiologisches Bulletin, 2008).

## VRE

- Für die Bestimmung der Herdenprävalenz von VRE bei Mastputen hat sich, wie auch für MRSA, die Entnahme von Staubproben repräsentativer Lokalisation in den Mastputenställen und deren Zusammenfassung zu Poolproben als ein geeignetes Verfahren herausgestellt.
- Mit 27% positiven Mastputen in 75% der untersuchten Betriebe konnte ein häufiges Vorkommen von VRE festgestellt werden, dessen Ursache nach wie vor noch nicht geklärt ist.
- Die Dominanz der in dieser Arbeit nachgewiesenen Resistenzgene *vanA* und *vanC1* entspricht den in der Literatur beschriebenen Daten. Nicht nachgewiesen werden konnten die Resistenzgene *vanB1/2/3* und *vanC2/3*.
- Obwohl sich die Staubpoolproben überwiegend als VRE-positiv erwiesen und sich ein Teil der beprobten Personen häufig im Putenstall aufhielt, konnten aus den von diesen Personen entnommenen Nasentupferproben keine VRE-Isolate gewonnen werden. Es bedarf deswegen weiterer Untersuchungen, um festzustellen, ob die Entnahme von Tupferproben aus der Nase als alleinige Lokalisation für den Nachweis von VRE-Keimen bei Personen geeignet ist und ob die Übertragung von VRE auf den Menschen aufgrund einer hohen VRE-Prävalenz bei Tieren eine Rolle spielt.

## 7 Zusammenfassung

### Untersuchungen zum Vorkommen von Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRS) und Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Putenmastbetrieben

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen von Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRS) und Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Mastputenbeständen sowie bei Personen dieser Betriebe zu ermitteln.

#### MRSA

Für den Nachweis von Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRS) wurden Kloaken- und Trachealtupferproben von insgesamt 200 Mastputen und Staubproben aus 20 Putenställen sowie Nasentupferproben von 59 Personen dieser Betriebe entnommen. Die Untersuchungen wurden gemäß den Vorgaben des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) auf der Grundlage der Entscheidung der Kommission 2008/55/EG mit Hilfe einer Kombination aus nicht selektiver Voranreicherung, selektiver Anreicherung und anschließender Kultivierung auf einer selektiven, chromogenen Agarplatte durchgeführt (Anon, 2008a; BfR, 2009). Die Identifizierung von Gattung und Spezies wurde mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) und der Nachweis des *mecA*-Gens mittels Real-Time PCR durchgeführt. Anschließend wurden die *mecA*-Gen tragenden Isolate molekularbiologisch mittels *spa*- und SCC*mec*-Typisierung charakterisiert. Bei je einem Isolat jedes identifizierten *spa*-Typs wurde zusätzlich der MLST-Typ bestimmt.

Nachgewiesen werden konnte MRSA bei 71,5% (143 von 200) der untersuchten Puten in insgesamt 90% (18 von 20) der Betriebe. Bei allen 18 positiven Betrieben ergab auch stets die Staubtupferprobe ein MRSA-positives Ergebnis. Somit kann eine Vereinfachung des Nachweises von MRSA-Keimen in Beständen bei Puten durch die Entnahme von Staubtupferproben mit ausreichender Sicherheit erreicht werden. Von den MRSA-positiven Tieren konnten 90,2% über eine alleinige Trachealtupferprobenentnahme als MRSA-positiv identifiziert werden. Dies ermöglicht beim Einzeltier den Nachweis von MRSA durch die ausschließliche Untersuchung einer Trachealtupferprobe.

Zusätzlich zu MRSA-Keimen traten in elf Betrieben auch MRSASA (Methicillin-resistente Staphylokokken, ausgenommen *S. aureus*) auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Mastputen nicht nur erheblich mit MRSA, sondern auch - wenn auch deutlich geringer - mit MRSASA-Keimen belastet waren.

Von den 59 mittels Nasentupferproben untersuchten Personen erwiesen sich 22 (37,3%) als Träger von MRSA und acht Personen (13,5%) als Träger von MRSASA. Betrachtet man den

Nachweis von MRSA unter Berücksichtigung der Frequenz des Aufenthaltes in den Putenställen so war die Chance der Besiedlung mit MRSA bei Personen, die sich regelmäßig in Putenställen aufhielten, im Vergleich zu Personen, die sich nur selten oder nie in Putenställen aufhielten, deutlich erhöht (OR = 3,43). Bei den beprobten Personen konnten ausschließlich und bei den beprobten Puten überwiegend MRSA-Isolate isoliert werden, die dem Sequenztyp ST398 und damit den livestock-associated MRSA (laMRSA) zugeordnet werden.

## **VRE**

Für den Nachweis von VRE-Keimen wurden Kloakentupferproben von 200 lebenden Puten und Staubtupferproben aus 20 Mastputenställen sowie von 59 Personen dieser Betriebe Nasentupferproben in diese Studie einbezogen. Der Nachweis der VRE-Keime wurde nach der von Ellerbroek et al. (2004) beschriebenen Methode durchgeführt, die ein Anreicherungsverfahren mittels Chromocult®-Enterokokken-Bouillon mit anschließender Kultivierung auf einem mit Vancomycin supplementierten Selektivagar kombiniert. Die Identifizierung der Enterokokken erfolgte mit Hilfe biochemischer Parameter nach Angaben von Ruoff et al. (2003) und der Nachweis der *vanA*-, *vanB1/2/3*-, *vanC1*- und *vanC2/3*-Resistenzgene mittels Real-Time PCR.

VRE-Keime konnten bei 27% (54 von 200) der untersuchten Puten in insgesamt 75% (15 von 20) der untersuchten Mastbetriebe nachgewiesen werden. Bei 93,3% der positiven Betriebe ergab die gepoolte Staubtupferprobe ein VRE-positives Ergebnis.

Das Spektrum nachgewiesener VRE-Resistenzgene beschränkt sich in der vorliegenden Studie ausschließlich auf das *vanA*-Gen (17,6%, 12 von 68) und das *vanC1*-Gen (82,4%, 56 von 68). Nicht nachgewiesen werden konnten die in die Untersuchungen einbezogenen Resistenzgene *vanB1/2/3* und *vanC2/3*.

Obwohl zu einem hohen Anteil VRE-Keime in den Staubproben nachweisbar waren, konnten bei keiner der 59 beprobten Personen VRE-Keime in Nasentupferproben isoliert werden.

## 8 Summary

### Investigations into the incidence of methicillin-resistant staphylococci (MRS) and vancomycin-resistant enterococci (VRE) on turkey farms

The objective of the work presented here is to investigate presence of methicillin-resistant staphylococci (MRS) and vancomycin-resistant enterococci (VRE) in turkey flocks and personnel on the respective farms.

#### MRSA

For evidence of methicillin-resistant staphylococci (MRS), cloaca and trachea swab samples were taken from a total of 200 turkeys and dust samples from 20 turkey houses as well as swab samples from the noses of 59 personnel on the respective farms. The investigations were conducted according to Federal Institute for Risk Assessment (BfR) guidelines based on Commission Decision 2008/55/EG using a combination of non-selective pre-enrichment, selective enrichment and subsequent cultivation on a selective, chromogenic agar plate (Anon, 2008a; BfR, 2009). The identification of genus and species was by Fourier transformation infrared spectroscopy (FT-IR) and *mecA* gene detection via real-time PCR. In conclusion, the isolate carrying the *mecA* gene was molecularbiologically characterised via *spa* and SCC*mec* typing. In each isolate of every identified *spa* type the MLST type was additionally determined.

MRSA could be detected in 71.5% (143 from 200) of the examined turkeys in a total of 90% (18 from 20) of the farms. In all 18 of the positive farms the dust swab samples always tested positive for MRSA. In this way testing for MRSA bacteria presence in turkey flocks can be simplified with sufficient reliability through collecting dust swab samples. 90.2% of the MRSA-positive birds could be identified through a trachea swab sample alone. This enables identification of MRSA presence with individual birds through testing the trachea sample only.

In addition to MRSA bacteria, MRS/SA (methicillin-resistant staphylococci, with exception of *S. aureus*) bacteria were also present on 11 of the farms. These results showed that the examined turkeys were not only substantially infected with MRSA bacteria but also - although to a clearly lesser extent – with MRS/SA bacteria.

From the 59 personnel examined via nose swab sampling, 22 of them (37.3%) were shown to be MRSA carriers and eight (13.5%) to be carriers of MRS/SA. Looking at the detection of MRSA in the light of the frequency of stay in the turkey stables so was the chance of colonization with MRSA in people who were regularly in turkey stables clearly increased, compared to people, who were rarely or never in turkey stables (OR = 3.43). MRSA isolates



belonging to the sequence type ST398 and, with that, the livestock-associated MRSA (laMRSA), were always isolated from the tested people and isolated in the majority of the cases from the tested turkeys.

## **VRE**

For detecting VRE bacteria in this study, cloaca swab samples were taken from 200 living turkeys and dust swab samples from 20 turkey houses as well as nose swab samples from 59 humans. The detection of VRE bacteria was carried out using the method described by Ellerbroek et al. (2004). This combines an enrichment procedure using Chromocult<sup>®</sup> enterococci broth with subsequent cultivation of a selective agar supplemented with vancomycin. The identification of the enterococci took place with the help of biochemical parameters according to Ruoff et al. (2003) and real-time PCR was applied for identifying the *vanA*, *vanB1/2/3* and *vanC2/3* resistance genes.

VRE bacteria could be identified in 27% (54 from 200) of the examined turkeys in total 75% (15 from 20) of the examined feeding farms. At 93.3% of the positive flocks was the pooled swab dust sample VRE-positive.

The spectrum of detected VRE resistance genes was limited in the study presented here to only the *vanA* gene (17.6%, 12 from 68) and the *vanC1* gene (82.4%, 56 from 68). The resistance genes *vanB1/2/3* and *vanC2/3* which were also tested for, could not be detected in the investigations.

Although VRE bacteria could be detected in a high proportion of dust samples, VRE bacteria were not isolated from the nose swab samples from any of the 59 persons sampled.

## 9 Anhang

Tabelle 50: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *Staphylococcus aureus*-Stämme zur Validierung der Real-Time PCR

<b>Bezeichnung</b>	<b>Resistenzgen</b>
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 2593	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 15214	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 15215	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat LGA Stuttgart 07LGA00460	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 3TM1	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 3TM2	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 3KM1	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 3SM1	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 4KM5_1	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 4TM1_1	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 4TM9_3	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 18462	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 19006	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 19086	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 16074	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 3039/1	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 2741	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 3032/1	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 2741	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 2728	<i>mecA</i> -positiv
Feldisolat CVUA Stuttgart 4TM2_6	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 4TM4_6B	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 4TM4_5	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 33844001	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 34917002	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 3537300	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 3538001	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 35697001	<i>mecA</i> -negativ

<b>Bezeichnung</b>	<b>Resistenzgen</b>
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 36429001	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 36486001	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 38693001	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 38243001	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 2452	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 3215/112	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 39783	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 397603	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 39759	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 3344	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 08L 38899/2	<i>mecA</i> -negativ
Feldisolat CVUA Stuttgart 03L 3350	<i>mecA</i> -negativ

Diagramm 9: Darstellung der Sequenzen des Alignments, des Vorwärtsprimers (F-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *mecA*-Gens unter Verwendung des F-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen EU790489, AB221124, AB221120 und EO9771 aus der NCBI-Datenbank

```

mecA_Alignment`orig          GACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAA
Vorwärts_Sequenzierung_mecA -----

mecA_Alignment`orig          AGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAGAGTA
Vorwärts_Sequenzierung_mecA -----ATTCTN-CTAACTNTTGNIGCTAANNTTAAAAAGANTN
                               ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
                               ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

mecA_Alignment`orig          TTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAGGTTACTGCTATCCACCTT
Vorwärts_Sequenzierung_mecA TTTATAACNACATGAAAAATGATTATGGCTCAGGTTACTGCTATCCACCTT
                               *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****
                               *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****

mecA_Alignment`orig          CAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAGCACACCTTCATATGACGTCTA
Vorwärts_Sequenzierung_mecA CAAACAGGTGAATTATTANCTTGTAAACNCNCCTTCATATGACGTCTA
                               *****  *****  *  *****  *  *  *****  *****  *****

mecA_Alignment`orig          TCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAAATTAACCGAAG
Vorwärts_Sequenzierung_mecA TCCNTTTATGNTGGCATGAGTAACGAANAATATAATAAAATTAACCGAAG
                               ***  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****

mecA_Alignment`orig          ATAAAAAGAACCCTCTGCTCAACAAGTCCAGATTACAACCTCACCAGGT
Vorwärts_Sequenzierung_mecA ATAAAAANANCCCTCTGCTCAACANNTCCANATTACAACCTCACCAGGT
                               *****  *  *****  *****  *****  *****  *****  *****

mecA_Alignment`orig          TCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTGGGTAAATAACAAAACATT
Vorwärts_Sequenzierung_mecA TCAACTNAAAAATATNAACANCAATGATTGGGTAAANAANAANAACATT
                               *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****

mecA_Alignment`orig          AGACGATAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGTTGGCAAAGATA
Vorwärts_Sequenzierung_mecA AGACNATAAACANGTTATAAAATCGNTGGNAANGNNGNAAAAANANA
                               ****  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****

mecA_Alignment`orig          AATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAAT
Vorwärts_Sequenzierung_mecA AATCTNGGGGNGGTTACAACNTTACAAGATATNAAGNGGTAATGGNAAT
                               *****  ****  *****  *****  *****  *****  *****  *****

mecA_Alignment`orig          ATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAG
Vorwärts_Sequenzierung_mecA ATCNACTTAAAAACAAGCAANANAATCNTCANATAANTTTTTTTTTT-----
                               ***  *****  *****  *  *****  ***  *****  *****  *****

mecA_Alignment`orig          AGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAAC
Vorwärts_Sequenzierung_mecA -----

mecA_Alignment`orig          TAGGTGTGGTGAAGATATACCAAGTATTCCATTTATAATGCTCAA
Vorwärts_Sequenzierung_mecA -----

mecA_Alignment`orig          ATTTCAAACAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTGAGTTA
Vorwärts_Sequenzierung_mecA -----

mecA_Alignment`orig          CGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATA
Vorwärts_Sequenzierung_mecA -----

mecA_Alignment`orig          GCGCATTAGAAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAGAGC
Vorwärts_Sequenzierung_mecA -----

mecA_Alignment`orig          ACGAAAAACAAAGTTTGAAGAAAAATATTATTTCCAAGAAAAATATCAA
Vorwärts_Sequenzierung_mecA -----

```

Diagramm 10: Darstellung der komplementären Sequenzen des Alignments, des Rückwärtsprimers (R-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *mecA*-Gens unter Verwendung des R-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen EU790489, AB221124, AB221120 und EO9771 aus der NCBI-Datenbank

```

MecA_Alignment_kompl          CTGCTATTATCGTTATGTTAGCGTGTATGTAATTATCTCTTTTTCTTTTT
Rückwärts_Sequenzierung_mecA -----

MecA_Alignment_kompl          TCTACCGTTTCTATAAGTTGATTGATAACTACGATTTCAGTTTTCTCAT
Rückwärts_Sequenzierung_mecA -----

MecA_Alignment_kompl          AAATATTGTTGTACTTTTTACTAATACCGAGTCCATGACGATAGGTGGGA
Rückwärts_Sequenzierung_mecA -----

MecA_Alignment_kompl          GTTTGTCCACTTAATAATCGTGAACATTCGTGTGGAAGTATACTGCAGAT
Rückwärts_Sequenzierung_mecA -----ATCGTGAACATTCGTGTGGAAGTATACTGCAGAT
                                  *****

MecA_Alignment_kompl          AGGTAAATACATACCGTACTCATTGCTTCTTATATTATTTAATGGCTTC
Rückwärts_Sequenzierung_mecA AGGTAAATACATACCGTAN-CATTNCTTCTTATATTATTTAATNGGCTTC
                                  *****

MecA_Alignment_kompl          TATTTTTTCTTGGAGACGAGTTGTTCAAGGTCTAATGTTGAAGTGGTCCA
Rückwärts_Sequenzierung_mecA TATTTTTTCTTGGAGACGAGTTGTTCAAGGT-TAANGTTGAAGTGGTCCA
                                  *****

MecA_Alignment_kompl          AGTTGAGTTTTTTTATAATTGTCGTTACTAACCCAATTTATGTTTTGTAA
Rückwärts_Sequenzierung_mecA AGTTGAGTTTTTTTATAATTGTCGTTACTAACC--AATTATGTTTTGTAA
                                  *****

MecA_Alignment_kompl          TCTGCTATTTTGTTCAATATTTAGCTACCATTTCCAACCGTTTTTCTAT
Rückwärts_Sequenzierung_mecA TCTGCTATTTTGTTCAATATTTAGCTACCATTTCCANC-GTTTTTCTAT
                                  *****

MecA_Alignment_kompl          TTAGAACCCCAACCAATGTTGCAATGTTCTATACTTCACCATTTACCATTA
Rückwärts_Sequenzierung_mecA T-AGAACCCCNCCAATGTTGCAATGTTNTATNTTC--NCATTTNC-ATTA
                                  *****

MecA_Alignment_kompl          TAGTGAATTTTGTTTCGTTATCTTAGTAGTCTATTGTAAGAAACGATC
Rückwärts_Sequenzierung_mecA TAGTGAATTTTGTTTCGNINTCCTTAGTAGTNTATTGTAAGAAACGATC
                                  *****

MecA_Alignment_kompl          TCATCGTGAGCTTAATCCGTCATTCTTTAAACTTTTTCCGTACTTTTTTG
Rückwärts_Sequenzierung_mecA TCATCGTGAGCTTAATCCGTCNTTCTNT-----
                                  *****

MecA_Alignment_kompl          ATCCACAACCACCTTCTATATGGTTCACTAATAGGTAAAATATTACGAGTT
Rückwärts_Sequenzierung_mecA -----

MecA_Alignment_kompl          TAAAGTTTGTTTTTAAATCTATTACTTTATAATAATCGACTAAGTCCAAT
Rückwärts_Sequenzierung_mecA -----

MecA_Alignment_kompl          GCCTGTCCACTTTATGACTAATTGGGTCATGCTAGGAAAGTTAGATAT
Rückwärts_Sequenzierung_mecA -----

MecA_Alignment_kompl          CGCGTAATCTTTTATTACCGTTATAAATGCGTGGAGTGAATAATTTCTG
Rückwärts_Sequenzierung_mecA -----

MecA_Alignment_kompl          TGCTTTTTGTTTCAAACCTTCTTTTATAATAAAGGTTTCTTTTATAGTT
Rückwärts_Sequenzierung_mecA -----

```

Diagramm 11: Darstellung der Sequenzen des Alignments, des Vorwärtsprimers (F-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanA*-Gens unter Verwendung des F-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen EF206284, EF206285, X56895 und EF206286 aus der NCBI-Datenbank

```

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      -----NCNGTT
vanA_Alignment_orig              TCTGCAATAGAGATAGCCGCTAACATTAATAAAGAAAAATACGAGCCGTT
                                   *  ***

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      ATACATTGGAATTACGAAATCTGGTGTATGGAAAATGTGCGAAAAACCTT
vanA_Alignment_orig              ATACATTGGAATTACGAAATCTGGTGTATGGAAAATGTGCGAAAAACCTT
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      GCGCGGAATGGGAAAACGACAATTGCTATTCTAGCTGTACTCTCGCCGGAT
vanA_Alignment_orig              GCGCGGAATGGGAAAACGACAATTGCTATTCTAGCTGTACTCTCGCCGGAT
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      AAAAAATGCACGGATTACTTGTAAAAAGAACCATGAATATGAAATCAA
vanA_Alignment_orig              AAAAAATGCACGGATTACTTGTAAAAAGAACCATGAATATGAAATCAA
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      CCATGTTGATGTAGCATTTTCAGCTTTGCATGGCAAGTCAGGTGAAGATG
vanA_Alignment_orig              CCATGTTGATGTAGCATTTTCAGCTTTGCATGGCAAGTCAGGTGAAGATG
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      GATCCATACAAGGCTCTGTTTGAATTGTCCGGTATCCCTTTTGTAGGCTGC
vanA_Alignment_orig              GATCCATACAAGGCTCTGTTTGAATTGTCCGGTATCCCTTTTGTAGGCTGC
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      GATATTCAAAGCTCANCAATTGTATGGACAAATCGTTGACATACATCGT
vanA_Alignment_orig              GATATTCAAAGCTCAGCAATTGTATGGACAAATCGTTGACATACATCGT
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      TCGGAAAAATGCTGGGATAGCTACTCCCGCCTTTTGGGTTATTAATAAAG
vanA_Alignment_orig              TCGGAAAAATGCTGGGATAGCTACTCCCGCCTTTTGGGTTATTAATAAAG
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      ATGATAGGCCGGTGGCAGCTACGTTTACCTATCCTGTTTTTGTAAAGCCG
vanA_Alignment_orig              ATGATAGGCCGGTGGCAGCTACGTTTACCTATCCTGTTTTTGTAAAGCCG
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      GCGCGTTCAGGCTCATCCTTCGGTGTGAAAAAAGTCAATAGCGCGGACGA
vanA_Alignment_orig              GCGCGTTCAGGCTCATCCTTCGGTGTGAAAAAAGTCAATAGCGCGGACGA
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      ATTGGACTACGCAATTGAATCGGCAAGACAATATGACAGCAAAATCTTAA
vanA_Alignment_orig              ATTGGACTACGCAATTGAATCGGCAAGACAATATGACAGCAAAATCTTAA
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      TTGAGCAGGCTGTTTCGGGCTGTGAGGTCGGTGTGCGGTATTGGGAAAC
vanA_Alignment_orig              TTGAGCAGGCTGTTTCGGGCTGTGAGGTCGGTGTGCGGTATTGGGAAAC
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      AGTGCCGCGTTAGTTGTGGCGAGGTGGACCAAAATCAGGCTGCAGTACGG
vanA_Alignment_orig              AGTGCCGCGTTAGTTGTGGCGAGGTGGACCAAAATCAGGCTGCAGTACGG
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      AATCTTTCGTATTCATCAGGAAGTCGAGCCGAAAAAGGCTCTGAAAACG
vanA_Alignment_orig              AATCTTTCGTATTCATCAGGAAGTCGAGCCGAAAAAGGCTCTGAAAACG
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      CAGTTATAACCGTTCCTCCGACAGCTTTCAGCAGAGGAGCGAGNNGNNGN
vanA_Alignment_orig              CAGTTATAACCGTTCCTCCGACAGCTTTCAGCAGAGGAGCGAGNNGNNGN
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanA      NANNACNGCGTTTTTCAGAGCCTTTTCCGGCTCGACTTCTGATGAATA
vanA_Alignment_orig              CAGGAAACG-GCAAAAAAATATATAAAGCGCTCGGCT-----
                                   *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Diagramm 12: Darstellung der komplementären Sequenzen des Alignments, des Rückwärtsprimers (R-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanA*-Gens unter Verwendung des R- Primers dar. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen EF206284, EF206285, X56895 und EF206286 aus der NCBI-Datenbank

```

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      -----NNCTATCGGCGATTGTAATTATTTCTTTTTATGCTCGGCAA
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        AGACGTTATCTCTATCGGCGATTGTAATTATTTCTTTTTATGCTCGGCAA
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      TATGTAACCTTAATGCTTTAGACCACATACCTTTTACACGCTTTTTGGAA
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        TAGGTAACCTTAATGCTTTAGACCACATACCTTTTACACGCTTTTTGGAA
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      CGCGCCTTACCCTTTTGCTGTTAACGATAAGTCGACATGAGAGCGGCCTA
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        CGCGCCTTACCCTTTTGCTGTTAACGATAAGTCGACATGAGAGCGGCCTA
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      TTTTTTTACGTGCCTAATGAACAATTTTCTTGGTACTTATACTTTAGTT
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        TTTTTTTACGTGCCTAATGAACAATTTTCTTGGTACTTATACTTTAGTT
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      GGTACAACCTACATCGTAAAAGTCGAAACGTACCGTTCAGTCCACTTCTAC
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        GGTACAACCTACATCGTAAAAGTCGAAACGTACCGTTCAGTCCACTTCTAC
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      CTAGGTATGTTCCAGACAACTTAACAGGCCATAGGGAAAACATCCGACG
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        CTAGGTATGTTCCAGACAACTTAACAGGCCATAGGGAAAACATCCGACG
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      CTATAAGTTTCGAGTCGTTAAACATACCTGTTTAGCAACTGTATGTAGCA
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        CTATAAGTTTCGAGTCGTTAAACATACCTGTTTAGCAACTGTATGTAGCA
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      ACGCTTTTTACGACCCTATCGATGAGGGCGGAAAACCAATAATTATTTTC
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        ACGCTTTTTACGACCCTATCGATGAGGGCGGAAAACCAATAATTATTTTC
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      TACTATCCGGCCACCGTCGATGCAAATGGATAGGACAAAAACAATTCGGC
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        TACTATCCGGCCACCGTCGATGCAAATGGATAGGACAAAAACAATTCGGC
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      CGCGCAAGTCCGAGTAGGAAGCCACACTTTTTTCAGTTATCGCGCCTGCT
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        CGCGCAAGTCCGAGTAGGAAGCCACACTTTTTTCAGTTATCGCGCCTGCT
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      TAACCTGATGCGTTAACTTAGCCGTTCTGTTATACTGTCTGTTTTAGAATT
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        TAACCTGATGCGTTAACTTAGCCGTTCTGTTATACTGTCTGTTTTAGAATT
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      AACTCGTCCGACAAAGCCCGACACTCCAGCCAACACGCCATAACCCTTTG
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        AACTCGTCCGACAAAGCCCGACACTCCAGCCAACACGCCATAACCCTTTG
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      TCACGGCGCAATCAACAACCGCTCCACCTGGTTTAGTCCGACGTCATGCC
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        TCACGGCGCAATCAACAACCGCTCCACCTGGTTTAGTCCGACGTCATGCC
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      TTAGAAAGCATAAGTAGTCCTTCAGCTCGGCCTTTTTCCGAGN-TTTTGC
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        TTAGAAAGCATAAGTAGTCCTTCAGCTCGGCCTTTTTCCGAGACTTTTGC
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      GTCAATATTGGNNNG-----
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        GTCAATATTGGCAAGGCGCTCGAAAGTCGTCTCCTCGCTCCTGCCTAT
                                     ***** *

Rückwärts_Sequenzierung_vanA      -----
_VRE_VanA_Alignment_kompl.        GTCCTTTGCCGTTTTTTTTATATTTTCGCGAGCCGACATCTCCAGATCG

```

Diagramm 13: Darstellung der Sequenzen des Alignments, des Vorwärtsprimers (F-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanB1*-Gens unter Verwendung des F-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen U00456 und ENEVANB aus der NCBI-Datenbank

```

Vorwärts_Sequenzierung_vanB1 -----
VRE_VanB_Alignment_orig      ATTGTCGTGGTATCCCTATGTINGGCTGNGATATTCAAAGCTCCGCANTTT

Vorwärts_Sequenzierung_vanB1 -----GCGGGCATCGCC
VRE_VanB_Alignment_orig      GCATGGACAAATCACTGGCCTACATTCTTACAAAAAATGCGGGCATCGCC
                               *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB1 GTCCCCGAATTTNAATG-ATTGAAAAAGGTGACAAACCGGAGGCGAGGAC
VRE_VanB_Alignment_orig      GTNCCCGAATTTCAAATGATTGANAAAGGTGACAAACCGGAGGCGNGNC
                               ** ***** * *

Vorwärts_Sequenzierung_vanB1 GCTTACCTACCCTGTCTTTGTGAAGCCGGCAGGTCAGGTTTCGTCCTTTG
VRE_VanB_Alignment_orig      GCTTACCTACCCTGTCTTTGTGAAGCCGGCAGGTCAGGTTTCGTCCTTTG
                               *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB1 GCGTAACCAAAGTAAACAGTACGGAAGAATAAACGCTGCGATAGAAGCA
VRE_VanB_Alignment_orig      GCGTAACCAAAGTAAACNGTACGGAAGAATAAACGCTGCGATAGAAGCA
                               *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB1 GCAGGACAATATGATGGAAAAATCTTAATTGAGCAAGCGATTTCGGGCTG
VRE_VanB_Alignment_orig      GCAGGACAATATGATGGAAAAATCTTAATTGAGCAAGCGATTTCGGGCTG
                               *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB1 TGAGGTCGGCTGCGCGGTCATGGGAAACGAGGATGATTGATTGTCGGCG
VRE_VanB_Alignment_orig      TGAGGTCGGNTGNGCGGTCATGGGNAACGAGGATGATTGATTGTCGGCG
                               ***** *

Vorwärts_Sequenzierung_vanB1 AAGTGGATCAAATCCGGTTGAGCCACGGTATCTTCCGCATCCATCAGGAA
VRE_VanB_Alignment_orig      AAGTGGATCAAATCCGGNTGAGCCACGGTATCTTCCGCATCCATCAGGAA
                               *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB1 AACGAGCCGAAAAAGGCTCAGAGAATGCGATGATTATCGTTCAGCAGA
VRE_VanB_Alignment_orig      AACGAGCCGAAAAAGGCTCAGANAATGCGATGATTANNGTTCNGCAGA
                               *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB1 CATTCCGGTCGAGGGANATNTCTCNN-----
VRE_VanB_Alignment_orig      CATTCCGGTCGAGGAACGAAATCGGGTGCANGAA
                               ***** *

```



Diagramm 14: Darstellung der komplementären Sequenzen des Alignments, des Rückwärtsprimers (R-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanB1*-Gens unter Verwendung des R-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen U00456 und ENEVANB aus der NCBI-Datenbank

```

Rückwärts_Sequenzierung_vanB1      -----
VRE_vanB_Alignment_kompl           TTCNTGCACCCGATTTTCGTTCCTCGACCGAATGTCTGCNGGAACNNTAA

Rückwärts_Sequenzierung_vanB1      -----CCTTTTTCCGGCTCGTTTTCTGATGGATGCGGA
VRE_vanB_Alignment_kompl           TCATCCATNTCTGAGCCTTTTTCCGGCTCGTTTTCTGATGGATGCGGA
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB1      AGATACCGTGGCTCAACCGGATTTGATCCACTTCGCCGACAATCAAATCA
VRE_vanB_Alignment_kompl           AGATACCGTGGCTCANCCGGATTTGATCCACTTCGCCGACAATCAAATCA
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB1      TCCTCGTTTCCCATGACCGCGCAGCCGACCTCACAGCCGAAATCGCTTG
VRE_vanB_Alignment_kompl           TCCTCGTTNCCCATGACCGCNCANCCGACCTCACAGCCGAAATCGCTTG
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB1      CTCAATTAAGATTTTCCATCATATTGCTCTGCTTCTATCGCAGCGT
VRE_vanB_Alignment_kompl           CTCAATTAAGATTTTCCATCATATTGCTCTGCTTCTATCGCAGCGT
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB1      TTAGTTCTCCGTA CTGTTTACTTTGGTTACGCCAAAGGACGAACCTGAC
VRE_vanB_Alignment_kompl           TNAGTTCTCCGTACNGTTTACTTTGGTTACGCCAAAGGACGAACCTGAC
                                     * *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB1      CGTGCCGGCTTCACAAAGACAGGGTAGGTAAGCGTCTCGCTCCGGTTT
VRE_vanB_Alignment_kompl           CGTGCCGGCTTCACAAAGACAGGGTAGGTAAGCGNNCNGCCTCCGGNTT
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB1      GTCACCTTTTCAATCATTGAAATTCGGGGACGGCGATGCCCGCATTTT
VRE_vanB_Alignment_kompl           GTCACCTTTTCAATCATTGAAATTCGGGNACGGCGATGCCCGCATTTT
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB1      TTGTAAGAATGTAGGCCAGTGATTGTCCATGCAANTCCCTN-----
VRE_vanB_Alignment_kompl           TTGTAAGAATGTAGGCCAGTGATTGTCCATGCAAANTGCGGAGCTTTGA
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB1      -----
VRE_vanB_Alignment_kompl           ATATCNCAGCCNACATAGGGGATACCAGACAAT

```

Diagramm 15: Darstellung der Sequenzen des Alignments, des Vorwärtsprimers (F-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanB2*-Gens unter Verwendung des F-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen AY145441 und ENEVANB2A aus der NCBI-Datenbank

```

Vorwärts_Sequenzierung_vanB2 -----
VRE_VanB_Alignment_orig      ATTGTCTGGTATCCCCTATGTINGGCTGNGATATTCAAAGCTCCGCANTTT

Vorwärts_Sequenzierung_vanB2 -----
VRE_VanB_Alignment_orig      GCATGGACAAATCACTGGCCTACATTCTTACAAAAAATGCGGGCATCGCC

Vorwärts_Sequenzierung_vanB2 -----GATAAAGGTGACAAGCCGGAGGCGGGTGC
VRE_VanB_Alignment_orig      GTNCCCGAATTCAAATGATTGANAAAGGTGACAANCCGGAGGCGNGNNC
                              ** ***** * *

Vorwärts_Sequenzierung_vanB2 GCTTACCTACCTGTCTTTGTGAAGCCGGCAGGTCAGGTTTCGTCCTTTG
VRE_VanB_Alignment_orig      GCTTACCTACCTGTCTTTGTGAAGCCGGCAGGTCAGGTTTCGTCCTTTG
                              *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB2 GCCTAACCAAAGTAAACGGGTACGGAAGAAGTAAACGCTGCGATAGAAGCG
VRE_VanB_Alignment_orig      GCGTAACCAAAGTAAACNGTACGGAAGAAGTAAACGCTGCGATAGAAGCN
                              ** *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB2 GCAGGACAATATGATGGAAAAATCTTAATTGAGCAAGCGATTTCGGGCTG
VRE_VanB_Alignment_orig      GCAGGACAATATGATGGAAAAATCTTAATTGAGCAAGCGATTTCGGGCTG
                              *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB2 TGAGGTCGGGTGTGCGGTCATGGGGAACGAGGATGATTGATTGTCGGCG
VRE_VanB_Alignment_orig      TGAGGTCGGNTGNGCGGTCATGGGNAACGAGGATGATTGATTGTCGGCG
                              ***** *

Vorwärts_Sequenzierung_vanB2 AAGTGGATCAAATCCGGCTGAGCCACGGTATCTTCCGCATCCATCAGGAA
VRE_VanB_Alignment_orig      AAGTGGATCAAATCCGGNTGAGCCACGGTATCTTCCGCATCCATCAGGAA
                              *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB2 AACGAGCCGAAAAAGGCTCA-----
VRE_VanB_Alignment_orig      AACGAGCCGAAAAAGGCTCAGANAATGCGATGATTANNGTCCNGCAGA
                              *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB2 -----
VRE_VanB_Alignment_orig      CATTCCGGTCGAGGAACGAAATCGGGTGCANGAA

```

Diagramm 16: Darstellung der komplementären Sequenzen des Alignments, des Rückwärtsprimers (R-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanB2*-Gens unter Verwendung des R-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen AY145441 und ENEVANB2A aus der NCBI-Datenbank

```

Rückwärts_Sequenzierung_vanB2      -----
VRE_vanB_Alignment_kompl          TTCNTGCACCCGATTTTCGTTCCTCGACCGAATGCTGCNGGAACNNTAA

Rückwärts_Sequenzierung_vanB2      -----
VRE_vanB_Alignment_kompl          TCATCCATTNTCTGAGCCTTTTTCCGGCTCGTTTTCTTGATGGATGCGGA

Rückwärts_Sequenzierung_vanB2      -----GCCGGATTTGATCCACTTCGCCGACAATCAAATCA
VRE_vanB_Alignment_kompl          AGATACCGTGGCTCANCCGGATTTGATCCACTTCGCCGACAATCAAATCA
                                  *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB2      TCCTCGTTCCCCATGACCGCACACCCGACCTCACAGCCGAAATCGCTTG
VRE_vanB_Alignment_kompl          TCCTCGTTNCCCATGACCGCNCANCCGACCTCACAGCCGAAATCGCTTG
                                  ***** ** *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB2      CTCAATTAAGATTTTCCATCATATTGTCCTGCCGCTTCTATCGCAGCGT
VRE_vanB_Alignment_kompl          CTCAATTAAGATTTTCCATCATATTGTCCTGCNGCTTCTATCGCAGCGT
                                  *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB2      TAAGTTCTTCCGTACCGTTTACTTTGGTTAGGCCAAAGGACGAACCTGAC
VRE_vanB_Alignment_kompl          TNAGTTCTTCCGTACNGTTTACTTTGGTTACGCCAAAGGACGAACCTGAC
                                  * *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB2      CGTGCCGGCTTACAAAGACAGGGTAGGTAAGCGCACCCGCTCCGGCTT
VRE_vanB_Alignment_kompl          CGTGCCGGCTTACAAAGACAGGGTAGGTAAGCGNNCNCGCTCCGGNTT
                                  ***** * *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB2      GTCACCTTATCAATCATTGAAATTCGGGAACGGCGATGCCCGATTTT
VRE_vanB_Alignment_kompl          GTCACCTTNTCAATCATTGAAATTCGGGNACGGCGATGCCCGATTTT
                                  *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB2      TTGTAAGANGNAGGCN-----
VRE_vanB_Alignment_kompl          TTGTAAGAATGTAGGCCAGTGATTGTCCATGCAAANTGGGAGCTTTGA
                                  ***** *

Rückwärts_Sequenzierung_vanB2      -----
VRE_vanB_Alignment_kompl          ATATCNCAGCCNACATAGGGGATACCAGACAAT

```

Diagramm 17: Darstellung der Sequenzen des Alignments, des Vorwärtsprimers (F-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanB3*-Gens unter Verwendung des F-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen U00456, ENEVANB, AY145441 und ENEVANB2A aus der NCBI-Datenbank

```

Vorwärts_Sequenzierung_vanB3 -----
VRE_VanB_Alignment_orig      ATTGTCGTGGTATCCCCTATGTNGGCTGNGATATTCAAAGCTCCGCANTTT

Vorwärts_Sequenzierung_vanB3 -----
VRE_VanB_Alignment_orig      GCATGGACAAATCACTGGCCTACATTCTTACAAAAAATGCGGGCATCGCC

Vorwärts_Sequenzierung_vanB3 -----GGTGACAAGCCGGAGACGGGTGC
VRE_VanB_Alignment_orig      GTNCCCGAATTTCAAATGATTGANAAAGGTGACAANCCGGAGGCGNGNC
                               *****  *****  * * * *

Vorwärts_Sequenzierung_vanB3 GCTTACCTACCCTGTCTTTGTGAAGCCGGCAGGTCAGGTTTCGTCCTTTG
VRE_VanB_Alignment_orig      GCTTACCTACCCTGTCTTTGTGAAGCCGGCAGGTCAGGTTTCGTCCTTTG
                               *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB3 GCTTAACCAAAGTAAACGGTACGGAAGAAGTAAACGCTGCGATAGAAGCG
VRE_VanB_Alignment_orig      GCGTAACCAAAGTAAACNGTACGGAAGAAGTAAACGCTGCGATAGAAGCN
                               ** *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB3 GCAGGACAATATGATGGAAAAATCTTAATTGAGCAAGCGATTTCGGGCTG
VRE_VanB_Alignment_orig      GCAGGACAATATGATGGAAAAATCTTAATTGAGCAAGCGATTTCGGGCTG
                               *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB3 TGAGGTCGGCTGTGCGGTTATGGGGAACGAGGATGATTGATTGTCGGCG
VRE_VanB_Alignment_orig      TGAGGTCGGNTGNGCGGTCATGGGNAACGAGGATGATTGATTGTCGGCG
                               *****  * * *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB3 AAGTGGATCAAATCCGGCTGAGCCATGGTATCTTCCGCATCCATCAGGAA
VRE_VanB_Alignment_orig      AAGTGGATCAAATCCGGNTGAGCCACGGTATCTTCCGCATCCATCAGGAA
                               *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB3 AACGAGCCGAAAAAGGCTCA-----
VRE_VanB_Alignment_orig      AACGAGCCGAAAAAGGCTCAGANAATGCGATGATTANNGTTCNGCAGA
                               *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanB3 -----
VRE_VanB_Alignment_orig      CATTCCGGTCGAGGAACGAAATCGGGTGCANGAA

```

Diagramm 18: Darstellung der komplementären Sequenzen des Alignments, des Rückwärtsprimers (R-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanB3*-Gens unter Verwendung des R-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen U00456, ENEVANB, AY145441 und ENEVANB2A aus der NCBI-Datenbank

```

Rückwärts_Sequenzierung_vanB3      -----
VRE_vanB_Alignment_kompl           TTCNTGCACCCGATTTTCGTTCTCTCGACCGAATGTCTGCNGGAACNNTAA

Rückwärts_Sequenzierung_vanB3      -----
VRE_vanB_Alignment_kompl           TCATCCATTNTCTGAGCCTTTTTCCGGCTCGTTTTCTTGATGGATGCGGA

Rückwärts_Sequenzierung_vanB3      -----TTGATCCACTTCGCCGACAATCAAATCA
VRE_vanB_Alignment_kompl           AGATACCGTGGCTCANCCGGATTTGATCCACTTCGCCGACAATCAAATCA
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB3      TCCTCGTTCCCCATAACCGCACAGCCGACCTCACAGCCCGAAATCGCTTG
VRE_vanB_Alignment_kompl           TCCTCGTTNCCCATGACCGCNCANCCGACCTCACAGCCCGAAATCGCTTG
                                     *****  *****  *****  ** *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB3      CTCAATTAAGATTTTCCATCATATTGCTCTGCCGCTTCTATCGCAGCGT
VRE_vanB_Alignment_kompl           CTCAATTAAGATTTTCCATCATATTGCTCTGCNGCTTCTATCGCAGCGT
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB3      TAAGTTCTTCCGTACCGTTTACTTTGGTTAAGCCAAAGGACGAACCTGAC
VRE_vanB_Alignment_kompl           TNAGTTCTTCCGTACNGTTTACTTTGGTTACGCCAAAGGACGAACCTGAC
                                     * *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB3      CGTGCCGGCTTCACAAAGACAGGGTAGGTAAGCGCACCCGCTCTCCGGCTT
VRE_vanB_Alignment_kompl           CGTGCCGGCTTCACAAAGACAGGGTAGGTAAGCGNNCNCGCTCCGGNTT
                                     *****  * * *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB3      GTCACCTTATCAATCATTGAAATTCGGGAACGGCGATGCCCGCATTTT
VRE_vanB_Alignment_kompl           GTCACCTTNTCAATCATTGAAATTCGGGNACGGCGATGCCCGCATTTT
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB3      TTGTAAGAATGTAGGCANN-----
VRE_vanB_Alignment_kompl           TTGTAAGAATGTAGGCCAGTGATTGTCCATGCAAANTGCGGAGCTTTGA
                                     *****

Rückwärts_Sequenzierung_vanB3      -----
VRE_vanB_Alignment_kompl           ATATCNCAGCCNACATAGGGGATACCAGACAAT

```

Diagramm 19: Darstellung der Sequenzen des Alignments, des Vorwärtsprimers (F-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanC1*-Gens unter Verwendung des F-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen EU151772, EU151771, EU151769, EU151770 und EU151768 aus der NCBI-Datenbank

```

Vorwärts_Sequenzierung_vanC1      -----
VRE_VanC1_Alignment_orig.         CCGCATTATGTATGAACAAATGGCTCTTGATCAACTTGCTGATACCATG

Vorwärts_Sequenzierung_vanC1      -----NTNCCGCTN--GAANCGATCC
VRE_VanC1_Alignment_orig.         GGAATCGCTAGTGCTCCCACTTTGCTTTTATCCCGCTATGAAAACGATCC
                                   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Vorwärts_Sequenzierung_vanC1      TGCN-CAATCGATCGTTTTATTNA-GACCATGGATTCCCGATCTTTATCA
VRE_VanC1_Alignment_orig.         TGCCACAATCGATCGTTTTATTCAAGACCATGGATTCCCGATCTTTATCA
                                   ***  *****  *  *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanC1      AGCCGAATGAAGCCGGTCTTCAAAGGGATCACAAAAGTAACTGACAAA
VRE_VanC1_Alignment_orig.         AGCCGAATGAAGCCGGTCTTCAAAGGGATCACAAAAGTAACTGACAAA
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanC1      ACAGCGCTCCAATTCGCATTAACGACTGCTTTTGCTTACGGTCTACTGT
VRE_VanC1_Alignment_orig.         ACAGCGCTCCAATTCGCATTAACGACTGCTTTTGCTTACGGTCTACTGT
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanC1      GTTGATCCAAAAGGCGATAGCGGGTATTGAAATTGGCTGCGGCATCTTAG
VRE_VanC1_Alignment_orig.         GTTGATCCAAAAGGCGATAGCGGGTATTGAAATTGGCTGCGGCATCTTAG
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanC1      GAAATGAGCAATTGACGATTGGTGCTTGTGATGCGATTCTCTTGTGCGAC
VRE_VanC1_Alignment_orig.         GAAATGAGCAATTGACGATTGGTGCTTGTGATGCGATTCTCTTGTGCGAC
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanC1      GGTTTTTTTGATTTTGAAGAGAAATACCAATTAATCAGCGCCACGATCAC
VRE_VanC1_Alignment_orig.         GGTTTTTTTGATTTTGAAGAGAAATACCAATTAATCAGCGCCACGATCAC
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanC1      TGTCCAGCACCATTGCCTCTCGCGCTTGAATCACAGATCAAGGAGCAGG
VRE_VanC1_Alignment_orig.         TGTCCAGCACCATTGCCTCTCGCGCTTGAATCACAGATCAAGGAGCAGG
                                   *****

Vorwärts_Sequenzierung_vanC1      CACANN-ACTATN-----
VRE_VanC1_Alignment_orig.         CACAGCTGCTTTATCGAACTGGG
                                   ****  ** *

```

Diagramm 20: Darstellung der komplementären Sequenzen des Alignments, des Rückwärtsprimers (R-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanC1*-Gens unter Verwendung des R-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen EU151772, EU151771, EU151769, EU151770 und EU151768 aus der NCBI-Datenbank

```

VRE_VanC1_Alignment_EU151771_      GCGGTAATACATACTTGTTTACCGAGAACGCTAGTTGAACGACTATGGTAC
Rückwärts_Sequenzierung_vanC1      -----TTNGTNTCAAAC
                                      * * *

_VRE_VanC1_Alignment_EU151771_     CCTTAGCGATCACGAGGGTGAACGAAAATAGGGCGATACTTTTGCTAGG
Rückwärts_Sequenzierung_vanC1     CCTTAGCGATCACGAGGGTGAACGAAAATAGGGCGATACTTTTGCTAGG
*****

_VRE_VanC1_Alignment_EU151771_     ACGGTGTTAGCTAGCAAATAAGTTCCTGGTACCTAAGGGCTAGAAATAGT
Rückwärts_Sequenzierung_vanC1     ACGGTGTTAGCTAGCAAATAAGTTCCTGGTACCTAAGGGCTAGAAATAGT
*****

_VRE_VanC1_Alignment_EU151771_     TCGGCTTACTTCGGCCAAGAAGTTTTCCCTAGTGTTCATTGACTGTTT
Rückwärts_Sequenzierung_vanC1     TCGGCTTACTTCGGCCAAGAAGTTTTCCCTAGTGTTCATTGACTGTTT
*****

_VRE_VanC1_Alignment_EU151771_     TGTCGCGAGGTTAGACGTAATTGCTGACGAAAACGAATGCCAAGATGACA
Rückwärts_Sequenzierung_vanC1     TGTCGCGAGGTTAGACGTAATTGCTGACGAAAACGAATGCCAAGATGACA
*****

_VRE_VanC1_Alignment_EU151771_     CAACTAGGTTTTCCGCTATCGCCATAACTTTAACCGACGCCGTAGAATC
Rückwärts_Sequenzierung_vanC1     CAACTAGGTTTTCCGCTATCGCCATAACTTTAACCGACGCCGTAGAATC
*****

_VRE_VanC1_Alignment_EU151771_     CTTTACTCGTTAACTGCTAACCACGAACACTACGCTAAAGAGAACAGCTG
Rückwärts_Sequenzierung_vanC1     CTTTACTCGTTAACTGCTAACCACGAACACTACGCTAAAGAGAACAGCTG
*****

_VRE_VanC1_Alignment_EU151771_     CCAAAAAAATAAACTTCTCTTTATGGTTAATTAGTCGCGGTGCTAGTG
Rückwärts_Sequenzierung_vanC1     CCAAAAAANNTAAACTTCTCTTTATGGTTAATTAGTCGCGGTGCTAGTG
*****

_VRE_VanC1_Alignment_EU151771_     ACAGGGTCGTGGTAACGGAGAGCGGAACCTTAGTGCTAGTTCCCTCGTCC
Rückwärts_Sequenzierung_vanC1     AN-GGGTCGTGGNN-----
* *****

_VRE_VanC1_Alignment_EU151771_     GTGTCGACGAAATAGCTTTGAACCC
Rückwärts_Sequenzierung_vanC1     -----

```

Diagramm 21: Darstellung der Sequenzen des Alignments, des Vorwärtsprimers (F-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanC2/3*-Gens unter Verwendung des F-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen ECU94523, ECU94525, EU151762, EU151764 und AY033764 aus der NCBI-Datenbank

```

VanC2/3_Vorwärts_Sequenzierung      ACCAGCAAGAACAATAATCGAAGCTTTTATCCAGACCCATGGCTTCCCAGTT
VRE_VanC2/3_Alignment_orig.         -----CCAGTT
                                         *****

VanC2/3_Vorwärts_Sequenzierung      TTCTTTAAGCCTAATGAAGCGGGCTCCTCAAAGGGATCACTAAAGTCAC
VRE_VanC2/3_Alignment_orig.         TTCTTTAAGCCTAATGAAGCGGGNTCCTCAAAGGGATCACTAAAGTCAC
                                         *****

VanC2/3_Vorwärts_Sequenzierung      CTGCGTTGAAGAAATCGCTTCTGCCTTAAAAGAAGCCTTACTTATTGTT
VRE_VanC2/3_Alignment_orig.         CTGCGTTGAAGAAATCGCTTCTGCCTTAAAAGAAGCCTTACTTATTGTT
                                         *****

VanC2/3_Vorwärts_Sequenzierung      CCGCAGTGCTCCTACAAAAAATATTGCCGGTGTGAGATCGGTTGCGGT
VRE_VanC2/3_Alignment_orig.         CCGCAGTGCTCCTACAAAAAATATTGCCGGTGTGAGATCGGTTGCGGT
                                         *****

VanC2/3_Vorwärts_Sequenzierung      ATTTTGGGCAACGACTCTTTGACTGTGCGGTGCTTGTGACGCCATTTTCATT
VRE_VanC2/3_Alignment_orig.         ATTTTGGGCAACGACTCTTTGACTGTGCGGTGCTTGTGACGCCATTTTCATT
                                         *****

VanC2/3_Vorwärts_Sequenzierung      AGTAGACGGCTTTTTCGATTTTGAAGAAAAGTACCAGCTGATCAGCGCCA
VRE_VanC2/3_Alignment_orig.         AG-----
                                         **

VanC2/3_Vorwärts_Sequenzierung      AAATCACCGTCCCTGCGCCATTGCCTGAAACGATTGAAACTAAGGTCANN
VRE_VanC2/3_Alignment_orig.         -----

VanC2/3_Vorwärts_Sequenzierung      TCCN
VRE_VanC2/3_Alignment_orig.         ----

```



Diagramm 22: Darstellung der komplementären Sequenzen des Alignments, des Rückwärtsprimers (R-Primer [unterstrichen]) und der DNA-Sequenzierung des *vanC2/3*-Gens unter Verwendung des R-Primers. Die Grundlage des Alignments bildeten die Gensequenzen ECU94523, ECU94525, EU151762, EU151764 und AY033764 aus der NCBI-Datenbank

```

vanC2/3_Rückwärts_Sequenzierun      GCTGAGCTTGTTCTTTGACCTTGGTTTCAATCGTTTCAGGCAATGGCGCA
vanC2/3_Alignment_komp.              -----

vanC2/3_Rückwärts_Sequenzierun      GGGACGGTGATTTTGGCGCTGATCAGCTGGTACTTTTCTTCAAAATCGAA
vanC2/3_Alignment_komp.              -----

vanC2/3_Rückwärts_Sequenzierun      AAAGCCGTCTACTAATGAAATGGCGTCACAAGCACCGACAGTCAAAGAGT
vanC2/3_Alignment_komp.              -----CTAATGAAATGGCGTCACAAGCACCGACAGTCAAAGAGT
                                     *****

vanC2/3_Rückwärts_Sequenzierun      CGTTGCCAAAATACCGCAACCGATCTCAACACCGGCAATATTTTTTTTGT
vanC2/3_Alignment_komp.              CGTTGCCAAAATACCGCAACCGATCTCAACACCGGCAATATTTTTTTTGT
                                     *****

vanC2/3_Rückwärts_Sequenzierun      AGGAGCACTGCGGAACAATAAGTAAAGGCTTCTTTTAAGGCAGAAGCGAT
vanC2/3_Alignment_komp.              AGGAGCACTGCGGAACAATAAGTAAAGGCTTCTTTTAAGGCAGAAGCGAT
                                     *****

vanC2/3_Rückwärts_Sequenzierun      TTCTTCAACGCAGGTGACTTTAGTGATCCCTTTTGAGGAGCCCGCTTCAT
vanC2/3_Alignment_komp.              TTCTTCAACGCAGGTGACTTTAGTGATCCCTTTTGAGGANCCCGCTTCAT
                                     *****

vanC2/3_Rückwärts_Sequenzierun      TAGGCTTAAAGAAAACCTGGGAAGCCATGGGTCTGGATAAAAGCTTCGATT
vanC2/3_Alignment_komp.              TAGGCTTAAAGAAAACCTGG-----
                                     *****

vanC2/3_Rückwärts_Sequenzierun      TGTNTTGCTGGAAA
vanC2/3_Alignment_komp.              -----

```

**Untersuchungen zum Vorkommen von Methicillin-resistenten Staphylokokken  
(MRSA) in Putenmastbetrieben**

**Fragebogen Teil 1**

Betrieb (Name und Anschrift):

.....  
.....  
.....

Mastdurchgang vom.....

Bestandsgröße (Hähne/Hennen):.....

Lebendgewicht:.....

Futtermittelverwertung:.....

Mortalität:.....

Rasse:.....

Herkunft der Tiere:.....

Befinden sich andere Tiere auf dem Betrieb?

Ja

Nein

Wenn Ja welche?

z.B. Hunde, Katzen, Schweine, Kühe

.....  
.....  
.....



Antibiotika Behandlungen während dieses Mastdurchgangs?

(oder Kopie der Stallkarte)

.....  
.....  
.....

Stallform:

Offen

Geschlossen

Einstreumaterial:.....

Sonstiges:

.....  
.....  
.....



**Untersuchungen zum Vorkommen von Methicillin-resistenten Staphylokokken  
(MRSA) bei Mitarbeitern von Putenmastbetrieben**

**Fragebogen Teil 2**

Betrieb (Name):.....

1. Wie häufig halten Sie sich im Putenstall auf?

Täglich                      mehrere Tage pro Woche                      einmal pro Woche

2. Geschlecht

Männlich                      Weiblich

3. Leben Sie mit Personen im Haushalt, die in der humanmedizinischen Patientenversorgung tätig sind? Z.B. Krankenpflege

Ja                      Nein                      Keine Angaben

Und zwar (Tätigkeit).....

4. Haben Sie regelmäßigen direkten Kontakt zu anderen Tieren außer Puten?

Ja                      Nein                      Keine Angaben

Welche:.....

5. Wenn ja, wurde bei diesen Tieren schon mal MRSA nachgewiesen, z.B. im Rahmen einer Studie?

Ja                      Nein                      Keine Angaben

Bei welchen Tieren: .....

6. Wurde bei Ihnen schon einmal MRSA nachgewiesen?

Ja                      Nein                      Keine Angaben

7. Welche der folgenden Aussagen sind für Sie zutreffend?

a. Bestehender Kontakt zu humanem MRSA-Träger

Ja                      Nein                      Keine Angaben

b. Krankenhausaufenthalt in letzten 12 Monaten

Ja                      Nein                      Keine Angaben

c. Antibiotika Therapie in letzten 12 Monaten

Ja                      Nein                      Keine Angaben

**Untersuchungen zum Vorkommen von Methicillin-resistenten Staphylokokken  
(MRSA) bei Mitarbeitern von Putenmastbetrieben**



## 10 Literaturverzeichnis

Aarestrup F. M., Y. Agerso, P. Ahrens, J. C. Ostergaard Jorgensen, M. Madsen, L. B. Jensen (2000): Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Vet Microbiol.* 74: 353-364

Abbot Y., B. Leggett, A. S. Rossney, F. C. Leonard, B. K. Markey (2010): Isolation rates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs, cats and horses in Ireland. *Vet Rec.* 10: 451-455

Ahn S.-H., H. Deshmukh, N. Johnson, L. G. Cowell, T. H. Rude, W. K. Scott, C. L. Nelson, A. K. Zaas, D. A. Marchuk, S. Keum, S. Kamertthon, B. K. Sharma-Kuinkel, G. D. Sempowski, V. G. Fowler Jr. (2010): Two genes on A/J chromosome 18 associated with susceptibility to *Staphylococcus aureus* infection by combined microarray and QTL Analyses. *Pathog.* 6: 1001-1088

AHO (2010a): Dänemark: Zweijähriges Moratorium bei Cephalosporinen in der Schweinproduktion. AHO Redaktion Großtiere. <http://www.animal-health-online.de> 14.06.2010

AHO (2010b): Dänemark: „Gelbe Karte“ und harte Auflagen bei zu hohem Antibiotikaverbrauch. AHO Redaktion Großtiere. <http://www.animal-health-online.de> 15.06.2010

AHO (2010c): Dänemark: Antibiotikaeinsatz bei Tieren soll um 50% reduziert werden. AHO Redaktion Großtiere. <http://www.animal-health-online.de> 11.12.2010

Anon (1996): Verordnung über die Aufhebung der futtermittelrechtlichen Zulassung von Avoparcin und Ronidazol als Zusatzstoff. *Bundesanzeiger.* 10: 397

Anon (1997): Richtlinie 97/6/EG der Kommission vom 30.1.1997 zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft L 128/22* vom 10.2.1997

Anon (2003): Richtlinie 2003/99/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17.11.2003 zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft L 325/31 vom 12.12.2003

Anon (2008a): Entscheidung der Kommission vom 20. Dezember 2007 über eine Finanzhilfe der Gemeinschaft für eine Erhebung in den Mitgliedstaaten über die Prävalenz von *Salmonella* spp. und Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* in Zuchtschweinebeständen. 2008/55/EG. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft L 14/10 vom 17.01.2008

Anon (2008b): AVV Zoonosen Lebensmittelkette - Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Erfassung, Auswertung und Veröffentlichung von Daten über das Auftreten von Zoonosen und Zoonoseerregern entlang der Lebensmittelkette vom 11. Juli 2008. Bundesanzeiger. 106: 2578

Arias C. A., P. Courvalin, P. E. Reynolds (2000): VanC cluster of Vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 1660-1666

Arthur M., P. Courvalin (1993): Genetics and mechanisms of glycopeptid resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 1563-1571

Arthur M., P. E. Reynolds, F. Depardieu, S. Evers, S. DutkaMalen, R. Quintiliani, P. Courvalin (1996): Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *J Infect.* 32: 11-16

Arthur M., F. Depardieu, G. Gerbaud, M. Galimand, R. Ledercq, P. Courvalin (1997): The vans sensor negatively controls vanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J Bacteriol.* 179: 97-106

Bager F., M. Madsen, J. Christensen, F. M. Aarestrup (1997): Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preven Vet Med.* 31: 95-112

Baker S. E., S. M. Brecher, E. Robillard, J. Strymish, E. Lawler, K. Gupta (2010): Extranasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at admission to an acute care Veterans Affairs hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 31: 42-46

Barber M. (1961): Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol.* 14: 385-393

Barret F. F., R. F. McGehee, M. Finland (1968): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. *N Engl J Med.* 279: 441-448

Bartels M. D., K. Boye, A. Rhod-Larsen, R. Skow, H. Westh (2007): Rapid increase of genetically diverse methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Copenhagen, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 13: 1533-1540

Bates J. (1997): Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. *J Hospital Infect.* 37: 89-101

Becker K., Peters G. (2009): Staphylokokken. In: Neumeister B., Geiss H. K., Braun R. W., Kimmig P. (Hrsg): *Mikrobiologische Diagnostik.* Thieme Verlag, Stuttgart. 2: 325-330

Bender R., S. Lange (2007): Die Vierfeldertafel. *Dtsch Med Wochenschr.* 132: 12-14

Bens C., A. Voss, C. H. W. Klaasen (2006): Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Clin Microbiol.* 44: 1875-1876

Blaha T., D. Meemken, R. Tegler (2008): Wie „emerging“ ist das Vorkommen von MRSA ST398 beim Schwein. *Dtsch Tierärztebl.* 7: 904-905

Böcher S., R. Smyth, G. Kahlmeter, J. Kerremans, M. C. Vos, R. Skoy (2008): Evaluation of four selective agars and two enrichment broths in screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 46: 3136-3138

Bohach G. A., T. J. Foster (2000): *Staphylococcus aureus* exotoxins. In: Fischetti V. A., R. Novick, J. Ferretti, D. A. Portnoy, J. I Rood (Hrsg.): *Gram-positive pathogens.* ASM Press, Washington DC: 367-378

Borgen K., M. Sorum, Y. Wasteson, H. Kruse (2001): VanA-type vancomycin enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avopracin was banned. *Int J Food Microbiol.* 64: 89-94

Bosch T., A. J. De Neeling, L. M. Schouls, K. W. Van der Zwaluw, J. A. Kluytmans, H. Grundmann, X. W. Huijsdens (2010): PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398. *BMC Microbiol.* 10: 40

Bourdon N., R. Berenger, R. Lepoultier, A. Mouet, C. Lesteven, F. Borgey, M. Fines-Guyon, R. Lederqcq, V. Cattoir (2010): Rapid detection of Vancomycin-resistant enterococci from rectal swabs by the Cepheid Xpert vanA/vanB assay. *Diagno Microbiol Inf Dis.* 67: 291-293

Boyce J. M., S. M. Opal, J. W. Chow, M. J. Zervos, G. Potter-Bynoe, C. B. Sherman, R. L. Romulo, S. Fortna (1994): Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol.* 32: 1148-1153

Boyce J. M., L. A. Mermel, M. J. Zervos, L. B. Rice, G. Potter-Bynoe, C. Giorgio, A. A. Medeiros (1995): Controlling Vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 16: 634-637

Boyd D. A., T. Du, R. Hizon, B. Kaplen, T. Murphy, S. Tyler, S. Brown, F. Jamieson, K. Weiss, M. R. Mulvey (2006): VanG-Type Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 2217-21

Boyd D. A., B. M. Willey, D. Fawcett, N. Gillani, M. R. Mulvey (2008). Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level Vancomycin resistance harbouring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 2667-2672

BTK/AGTAM, Bundestierärztekammer (BTK), Arbeitsgruppe Tierarzneimittel (AGTAM) der Länderarbeitsgemeinschaft Verbraucherschutz (2010): Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakterielle wirksamen Tierarzneimitteln. Beilage zum Deutschen Tierärzteblatt. 10

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (2009): Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz von MRSA in Zuchtschweine-Beständen. Stellungnahme Nr.: 044/2009

Bustamante W., A. Alpizar, S. Hernández, A. Pacheco, N. Vargas, M. L. Herrera, A. Vargas, M. Caballero, F. Garcia (2003): Predominance of vanA genotype among vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates from poultry and swine in Costa Rica. *Appl Environ Microbiol.* 69: 7414-7419



Butaye P., L. Deveriese, H. Goossens, M. Leven, F. Haesebrouck (1999a): Enterococci with acquired Vancomycin resistance in pigs and chickens of different age groups. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 365-366

Butaye P., L. Deveriese, F. Haesebrouck (1999b): Comparison of direct and enrichment methods for the selective isolation of Vancomycin-resistant enterococci from feces of pigs and poultry. *Microb Drug Resist.* 5: 131-134

Cardona C. J., A. A. Bickford, B. R. Charlton, G. L. Cooper (1993): *Enterococcus durans* infection in young chickens associated with bacteremia and encephalomalacia. *Avian Dis.* 37: 234-239

Carias L. L., S. D. Rudin, C. J. Donskey, L. B. Rice (1998): Genetic linkage and cotransfer of a novel, vanB-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. *J Bacteriol.* 189: 4426-4434

Centeno J. A. (1996): Main microbial flora present as natural starter in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *Int J Food Microbiol.* 33: 307-313

Cetinkaya Y., P. Falk, C. G. Mayhall (2000): Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 13: 686-707

Chadfield M. S., J. P. Christensen, H. Christensen, M. Bisgaard (2004): Characterization of streptococci and enterococci associated with septicaemia in broiler parents with a high prevalence of endocarditis. *Avian Pathol.* 33: 610-617

Chambers H. F. (1997): Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical implications. *J Clin Microbiol.* 10: 781-791

Chapin A., A. Rule, K. Gibson, T. Buckley, K. Schwab (2005): Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Enviro Helath Perspect.* 113: 137-142

Clark N., L. Teixeira, R. Facklam, F. Tenover (1998): Detection and differentiation of vanC1, vanC2 and vanC3 glycopeptide resistance genes in enterococci. *J Clin Microbiol.* 36: 2294-2297

Courvalin P. (1990): Resistance of enterococci to glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 2291-2296

Courvalin P. (2006): Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis.* 42: 25-34

Cuny C., J. Kuemmerle, C. Stanek, B. Willey, B. Strommenger, W. Witte (2006): Emergence of MRSA Infections in horses in a veterinary Hospital: Strain Characterisation and comparison with MRSA from humans. *Euro Surveill.* 11: 44-47

Cuny C. (2008): Auftreten und Verbreitung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) als Besiedler und Infektionserreger bei Pferden und der Vergleich mit MRSA von Menschen. Dissertation an der Veterinärmedizinischen Universität, Wien

Cuny C., C. Stanek, W. Witte (2009): MRSA aus der Sicht des RKI: Nachweis bei Menschen und anderen Tieren- eine kommende Zoonose? *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 116: 284-290

Cuny C., A. Friedrich, S. Kozytska, F. Layer, U. Nubel, K. Ohlsen, B. Stommenger, B. Walther, L. Wieler, W. Witte (2010): Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animals species. *Int J Med Microbiol.* 300: 109-117

Dahl K. H., G. S. Simonsen, O. Olsvik, A. Sundsfjord (1999): Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of Vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 1105-1110

Dahl K. H., E. W. Lundblad, T. P. Rokenes, O. Olsvik, A. Sundsfjord (2000): Genetic linkage of the vanB2 gene cluster to Tn5382 in Vancomycin-resistant enterococci and characterization of two novel insertion sequences. *Microbiol.* 146: 1469-1479

De Boer E., J. T. M. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit, X. W. Huijsdens, A. J. de Neeling, T. Bosch, R. A. A. van Oosterom, A. Vila, A. E. Heuvelink (2008): Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol.* 134: 52-56

De Neeling A. J., M van den Broeh, E. C. Spalburg, M. G. van Santen-Verheuver, W. Dam-Deisz, H. C. Boshuizen, A. de Giessen, E. van Duijkeren, X. W. Huijsdens (2007): High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol.* 122: 366-372

De Niederhäusern S., C. Sabia, P. Messi, E. Guerrieri, G. Manicardi, M. Bondi (2007): VanA-type vancomycin-resistant enterococci in equine and swine rectal swabs and in human clinical samples. *Curr Microbiol.* 55: 240-246

Depardieu F., M. L. Foucault, J. Bell, A. Dubouix, M. Guibert, J. P. Lavigne, M. Levast, P. Courvalin (2009): New Combination of Mutations in vanD-Type Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus avium* Strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 1952-1963

Descheemaeker P., C. Lammens, B. Pot, P. Vandamme, H. Goossens (1997): Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for enterococci important in human medicine. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 555-561

Descheemaeker P., S. Chapelle, L. A. Devriese, P. Butaye, P. Vandamme, H. Goossens (1999): Comparison of glycopeptide resistance genes of human and animal origins. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 2032-2037

Deurenberg R. H., E. E. Stobberingh (2009): The Molecular Evolution of Hospital- and Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Molecular Med.* 9: 100-115

Devriese L. A., L. R. van Damme, L. Famerey (1972): Methicillin (cloxacillin)- resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zbl Veterinärmed.* B19: 598-605

Devriese L. A., J. Hommez (1975): Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res Vet Sci.* 19: 23-27

Devriese L. A., J. Hommez, R. Wijfels, F. Haesebrouck (1991): Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *J Appl Bacteriol.* 71: 46-50

Devriese L. A., M. Vancanneyt, M. Baele, M. Vannechoutte, E. De Graef, C. Snauwaert, I. Cleenwerck, P. Dawyndt, J. Swings, A. Decostere, F. Haesebrouck (2005): *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55: 1569-1573

Dullweber A. (2010): Untersuchungen zum Vorkommen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Geflügelmastbeständen. Dissertation an der Tierärztlichen Hochschule, Hannover

Dutka-Malen S., B. Blaimont, G. Wauters, P. Courvalin (1994): Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 1675-1677

Edmond M. B., J. F. Ober, D. L. Weinbaum, M. A. Pfaller, T. Hwang, M. D. Sanford, R. P. Wenzel (1995): Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. *Clin Infect Dis.* 20: 1126-1133

Edmond M. B., J. F. Ober, J. D. Dawson, D. L. Weinbaum, R. P. Wenzel (1996): Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: natural history and attributable mortality. *Clin Infect Dis.* 23: 1234-1239

EFSA (2008): Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. Andreoletti O., H. Budka, S. Buncic, P. Colin, J. D. Collins, A. De Koeijer, J. Griffin, A. Havelaar, J. Hope, G. Klein, H. Kruse, S. Magnino, A. M. López, J. McLauchlin, C. Nguyen-The, K. Noeckler, B. Noerrung, M. Prieto Maradona, T. Roberts, I. Vagsholm, E. Vanopdenbosch (Hrsg). *EFSA J.* 993: 1-73

Ellerbroek L., H. Wichmann-Schauer, K. N. Mac (2004): Methoden zur Identifizierung und Isolierung von Enterokokken und deren Resistenzbestimmungen. BfR-Wissenschaft, Berlin

Enright M. C., N. J. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, B. G. Spratt (2000): Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 38: 1008-1015

Enright M. C., A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann, B. G. Spratt (2002): The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS.* 99: 7687-7692

Epidemiologisches Bulletin (2003): Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) in deutschen Alten- und Pflegeheimen – zur Situation. RKI, *Epidemiologische Bulletin.* 19: 145-14

Epidemiologisches Bulletin (2008): Kommentar zu den „Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von MRSA-Stämmen in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen“. RKI, Epidemiologisches Bulletin. 42: 363-364

Epidemiologisches Bulletin (2009): Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2008. Bericht aus dem Nationalen Referenzzentrum für Staphylokokken. RKI, Epidemiologisches Bulletin. 17: 155-160

Eom J. S., I. S. Hwang, B. Y. Hwang, J. G. Lee, Y. J. Lee, H. J. Cheong, Y. H. Park, S. C. Park, W. J. Kim (2004): Emergence of vanA genotype Vancomycin-resistant enterococci with low or moderate levels of teicoplanin resistance in Korea. J Clin Microbiol. 42: 1785-1786

Fang H., C. E. Nord, M. Ullberg (2010): Screening for vancomycin enterococci: results of a survey in Stockholm. APMIS. 118: 413-417

Fetsch A., B.-A. Tenhagen, B. Guerra, S. Hertwig, J.-A. Hammerl, A. Käsbohrer, J. Bräunig, B. Appel (2009a): Risikoabschätzung von laMRSA in der Lebensmittelkette- Molekulare Diagnostik als Werkzeug zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge. Dtsch Tierärztl Wochenschr. 116: 291-296

Fetsch A., B.-A. Tenhagen, B. Kraushaar, B. Guerra, A. Schroeter, J.-A. Hammerl, J. Bräunig, A. Käsbohrer, K. Alt, B. Appel (2009b): Diversität der laMRSA in der Lebensmittelkette. BfR Zoonosen und Lebensmittelsicherheit, Berlin, Tagungsband 2009: 103-106

Fetsch A., B. Kraushaar, B. Guerra-Roman (2010): MRSA from farm to fork – impact on food safety. Abstracts of the International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. 8: 3

Fines M., B. Pericondritis, P. Reynolds, D. F. Sahm, P. Courvalin (1999): VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. Antimicrob Agents Chemother. 42: 2161-2164

Fluegge K., B. Adams, U. L. Volksbeck, A. Serr, P. Henneke, R. Berner (2006): Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a southwestern region of Germany. Europ J Pediatric. 165: 688-690

Frainow, H., D. Jungkind, D. Lander, D. Delso, J. Dean (1994): Urinary tract infection with *Enterococcus faecalis* isolate that requires Vancomycin for growth. *Ann Intern Med.* 121: 1-24

Franz C. M. A., W. H. Holzapel, M. E. Stiles (1999): Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol.* 47: 1-24

Fraser, A. M., V. Arcus, P. Kong, E. Baker, T. Proft (2000): Superantigens powerful modifiers of the immune system. *Mol Med Today.* 6: 125-132

Frenay H. M., A. E. Bunschoten, L. M. Schouls, W. J. Van Leeuwen, C. M. Vandenbroucke-Grauls, J. Verhoef, F. R. Mooi (1996): Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 15: 60-64

Frick J. (2010): Prävalenz von Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSA) in bayerischen Schweinebeständen. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Frieden T. R., S. S. Munsiff, D. E. Low, B. M. Willey, G. Williams, W. Eisner, S. Warren, B. Kreiswirth (1993): Emergence of Vancomycin-resistant enterococci in New York City. *Lancet.* 342: 76-79

Fehlhaber K. (2001): Bedeutung des Geflügelfleisches. In: Fries R., V. Bergmann, K. Fehlhaber (Hrsg): Praxis der Geflügelfleischuntersuchung. Schlütersche GmbH, Hannover: 11

Fulhorst D., D. Aldehoff, S. Cortez de Jäckl, S. Monecke (2010): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkeys. Abstracts of the International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. 8: 6

FVE - Federation of Veterinarians of Europe (2010): Antimicrobial resistance. Newsletter December 2010, Brüssel

FVE - Federation of Veterinarians of Europe (1999): Antibiotikaresistenz & Vernünftiger Einsatz von Antibiotika in der Tiermedizin, Brüssel

Garnier F., S. Taourit, P. Glaser, P. Courvalin, M. Galimand (2000): Characterization of transposon Tn1549, conferring vanB-type resistance in *Enterococcus* spp.. *Microbiology SGM*. 146: 1481-1489

Gerlach H. (2000): Staphylokokken-Infektion des Geflügels. In: Wiesener E., R. Ribbeck (Hrsg.): *Lexikon der Veterinärmedizin*. Enke Verlag, Stuttgart. 4: 1382

GERMAP (2008): Antibiotika-Resistenz und Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Hsg. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Freiburg. 1

Ghaznavi-Rad E., M. N. Shamsudin, Z. Sekawi, L. Y. Khoon, M. N. Aziz, R. A. Hamat, N. Othman, P. P. Chong, A. Van Belkum, H. Ghasemzadeh-Moghaddam, V. Neela (2010): Predominance and Emergence of Clones of Hospital- Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. *J Clin Microbiol*. 48: 867-872

Gold H. S., S. Ünal, E. Cercenado, C. Thauvin-Eliopoulos, G. M. Eliopoulos, C. B. Wennerstein, R. C. Moellering (1993): A gene conferring resistance to Vancomycin but not Teicoplanin in isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* demonstrates homology with vanB, vanA and vanC genes of enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 8: 1604-1609

Gonzales R., J. F. Steiner, M. A. Sand (1997): Antibiotic prescribing for adults with colds, upper respiratory tract infections, and bronchitis by ambulatory care physicians. *JAMA*. 278: 901-904

Graveland H., E. Van Duijkeren, A. Van Nes, A. Schoormans, M. Broekhuizen-Stins, I. Oosting- van Schothorst, D. Heederik, J. A. Wagenaar (2009): Evaluation of isolation procedures and chromogenic agar media for the detection of MRSA in nasal swabs from pigs and veal calves. *Vet Microbiol*. 139: 121-125

Grisold A., E. Leitner, G. Mühlbauer, E. Marth, H. H. Kessler (2002): Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Confirmation by Automated Nucleic Acid Extraction and Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. 40: 2392-2397

Guardabassi L., M. E. Loeber, A. Jacobson (2003): Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology*. 98:23-27

Guardabassi L., S. Schwarz, D. H. Loyd (2004): Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 54: 321-332

Hafez M., S. Jodas (1997): *Putenkrankheiten*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 73-76

Handwerger S., J. Skoble, L. F. Discotto, M. J. Pucci (1995): Heterogeneity of the *vanA* gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 39: 362-368

Hasman H., A. Moodley, L. Guardabassi, M. Stegger, R. L. Skov, F. M. Aarestrup (2010): Spa Typing distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Vet Microbiol*. 141: 326-331

Hayden M. K., R. N. Picken, D. F. Sahm (1997): Heterogeneous expression of glycopeptide resistance in enterococci associated with transefer of *vanB*. *Antimicrobi Agents Chemother*. 41: 872-874

Helm D., Labischinski H., Schallhehn G., Naumann D. (1991): Classification and identification of bacteria by Fourier-transformed infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol*. 177: 69-79

Herold B. C., L. C. Immergluck, M. C. Maranan, D. S. Lauderdale, R. E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C. D. Leitch, R. S. Daum (1998): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*. 279: 593-598

Heuck D., G. Fell, O. Hamouda, H. Claus, W. Witte (2000): Erste Ergebnisse einer überregionalen Studie zur MRSA-Besiedelung bei Bewohnern von Alten- und Pflegeheimen. *Hygiene und Medizin*. 24: 72-80

Heudorf U., U. Tessmann (2008): Multiresistente Keime – MRSA, MRE, VRE etc. Rückbesinnung auf bewährte Hygienemaßnahmen ist Gebot der Stunde. *Hessisches Ärztebl*. 11: 707-709



Hiramatsu K., L. Cui, M. Kuroda, T. Ito (2001): The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trend Microbiol.* 9: 486-493

Hof H., R. Dörries (2005): Staphylokokken. In: Bob A., K. Bob (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie, Duale Reihe*. Thieme Verlag, Stuttgart. 3: 297-306

Hope W. W., A. P. Morton, D. F. M. Looke, J. M. Schooneveldt, G. R. Nimmo (2004): A PCR method for the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from screening swabs. *Pathology.* 36: 265-268

Horlacher S., Rau J. (2006): Mikroorganismen-Differenzierung mittels IR-Spektroskopie. *Fleischwirtschaft* 9: 134-136

Holzgrabe, U. (2010): Neue Antibiotika - Den Vorsprung wahren (2010): *Pharmazeutische Zeitung Online*. <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=31957>

Hudson I. R. (1994): The efficacy of intranasal mupirocin in the prevention of staphylococcal infections: a review of recent experience. *J Hospital Infect.* 27: 81-98

Huijsdens X., B. Van Dijke, E. Spalburg, M. G. Santen-Verheувel, M. E. Heck, G. N. Pluister, A. Voss, W. J. Wannet, A. J. De Neeling (2006): Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrobiol.* 5: 26–29

Huletsky A., P. Lebel, B. Lederc, N. Boucher, A. Bernal, J. Frenette, D. Ke, F. Picard, M. Ouelette, P. Roy, M. Bergeron (2001): Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci directly from rectal swabs by real-time PCR using the Smart Cycler. *Abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy.* 41: 409

Hummel R., Witte W. (1979): *Staphylococcus aureus* Infektionen beim Hausgeflügel. 1. Ökologie und Epizootologie. *Aech Exp Veterinarmed.* 33: 831-835

Ito T., Y. Katayama, K. Hiramatsu (1999): Clonig and Nucleotide Sequence Determination of the Entire *mec* DNA of Pre-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicob Agents Chemother.* 43: 1449-1458

Ito T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, K. Hiramatsu (2001): Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*

Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 1323-1335

Jacobsen B. (1963): Investigation of enterococci in humans and in animals. The occurrence of enterococci in food materials, and particularly in milk products. *Zbl Bak Parasiten Infektionskrankheiten Hyg.* 189: 261-274

Jansen M. D., A. T. Box, A. C. Fluit (2009): SCCmec typing in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of animal origin. *Emerg Infect Dis.* 15: 136-137

Jefts P., L. Nisbet (1988): Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

Johnsen P. J., J. I. Osterhus, H. Slevold, M. Sorum, H. Kruse, K. Nielsen, G. S. Simonsen, A. Sundsfjord (2005): Persistence of animal and human glycopeptide-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms associated with a widespread formerly exposed to avoparcin is plasmid-mediated vanA element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population. *Appl Environ Microbiol.* 71: 159-168

Joo Y., A. Lee, S. Lym, J. Moon, S. Wee, H. Kang, J. Kim, O. Kim, M. Kim (2001): Distribution of methicillin-resistant and enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from mastitic milk of dairy cows in Korea. Abstracts of the general Meeting of the American Society for Microbiology. 101: 751

Kang H., J. Moon, Y. Joo, B. Jung, J. Kim, C. Chung, O. Kim (2003): Distribution and Van gene types of vancomycin-resistant enterococci in Korea livestock. Abstract of the General Meeting of the American Society for Microbiology. 103: 33

Kaszanyitzky E. J., S. Janosi, P. Somogyi, A. Dan, L. Van der Graaf-van Bloois, E. Van Duijkeren, J. Wagenaar (2007): MRSA Transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis.* 13: 630-632

Katayama Y., T. Ito, K. Hiramatsu (2000): A new Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 1549-1555

Kateete D. P., C. N. Kimani, F. A. Katabazi, A. Okeng, M. S. Okee, A. Nanteza, M. L. Joloba, F. C. Najjuka (2010): Identification of *Staphylococcus aureus* Dnase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 9: 23

Kawano J., Shimizu A., Y. Saitoh, M. Yagi, T. Saito, R. Okamoto (1996): Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* from chicken. *J Clin Microbiol.* 9: 2072-2077

Kayser F. H. (1998): Ursprung und Evolution der Antibiotikaresistenz. Verein Forschung für Leben, Zürich. 51

Kenner J., T. O'Connor, N. Piantanida, J. Fisbain, B. Eberly, H. Viscount, C. Uvehara, D. Hospenthal (2003): Rates of carriage of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in an outpatient population. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 24: 439-444

Khan S. A., M. S. Nawaz, A. A. Khan, R. A. Jones, C. E. Cerniglia (2002): Molecular analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) spp. from poultry and dairy farms. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology. 102: 5

Khanna T., R. Friendship, C. Dewey, J. S. Weese (2008): Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol.* 128: 298–303

Klare I., H. Heier, H. Claus, W. Witte (1993): Environmental strains of *Enterococcus faecium* with inducible High-level resistance to glycopeptides. *FEMS Microbiol Lett.* 106: 23-30

Klare I., H. Heier, H. Claus, G. Bohme, S. Marin, G. Seltmann, R. Hakenbeck, V. Antanassova, W. Witte (1995a): *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microbiol Drug Resistance.* 125: 165-172

Klare I., H. Heier, H. Claus, R. Reissbrodt, W. Witte (1995b): VanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiol Lett.* 125: 165-172

Klein G., A. Pack, G. Reuter (1998): Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl Environ Microbiol.* 64: 1825-1830

Kloss W. E., K. H. Schleifer (1986): Staphylococcus. In: Sneath P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe und J. G. Holt (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. 2: 1013-1035

Klotz M., S. Zimmermann, S. Opper, K. Heeg, R. Mutters (2005): Possible risk for re-colonization with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) by faecal transmission. *Int J Hyg Environ Health.* 208: 401-405

Kluytmans J., A. Van Belkum, H. Verbrugh (1997): Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanism, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 10: 505-520

Kimmig P. (2009). In: Neumeister B., Geiss H. K., Braun R. W., Kimmig P. (Hrsg): *Mikrobiologische Diagnostik*. Thieme Verlag, Stuttgart. 2: 333-351

Kitzrow M. (2000): Staphylococcus aureus in Europa - Epidemiologie, Resistenzverhalten und Typisierung. Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Knudtson L. M., P. A. Hartman (1993): Enterococci in pork processing. *J Food Prot.* 56: 6-9

Köck R., J. Harlizius, N. Bressan, R. Laerberg, L. H. Wieler, W. Witte, R. H. Deurenberg, A. Voss, K. Becker, A. W. Friedrich (2009): Prevalence and molecular characteristic of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 28: 1375-1382

Kolar M., R. Pantucek, J. Bardon, L. Cekanova, M. Kesselova, P. Sauer, I. Vagnerova, D. Koukalova (2005): Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in humans and animals in the Czech republic between 2002 and 2004. *J Med Microbiol.* 54: 965-967

Kotzamanidis C., A. Zdragas, A. Kourelis, E. Moraitou, A. Papa, V. Yiantzi, C. Pantelidou, M. Yiangou (2009): Characterization of vanA-Type Enterococcus faecium isolates from urban and hospital wastewater and pigs. *J Appl Microbiol.* 107: 997-1005

Krischner C. (2004): Charakterisierung und Differenzierung von humanpathogenen Mikroorganismen mittels schwingungsspektroskopischer Techniken. Dissertation an der Freien Universität, Berlin

Kroker R. (2006): Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen. In: Löscher W., Ungemach F. R., Kroker R. (Hrsg): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Parey Verlag, Stuttgart. 7: 234-278

Kruse H., B. K. Johansen, L. M. Rorvik, G. Schaller (1999): The use of avoparcin as a growth promoter and the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus* species in Norwegian poultry and swine production. *Microbiol Drug Resist.* 5: 135-139

Kuhn I., A. Iversen, M. Finn, C. Greko, L. G. Burman, A. R. Blanch, X. Vilanova, A. Manero, H. Taylor, J. Caplin, L. Dominguez, I. A. Herrero, M. A. Moreno, R. Mollby (2005): Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Appl Environ Microbiol.* 71: 5383-5390

Lamikanra A., B. D. Paul, O. B. Akinwale, M. O. Paul (1985): Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in a population of healthy Nigerian students. *J Med Microbiol.* 19: 211-216

Lancefield R. C (1933): A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J Experiment Med.* 57: 571-595

Leavis H. L., R. J. L. Willems, J. Top, M. J. J. Bonten (2006): High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 44: 1059-1064

Leclercq R., E. Derlot, J. Duval, P. Courvalin (1988): Plasmid-mediated resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 319: 157-161

Lécuyer C. (1967): Exudative epidermitis in pigs. Bacteriological studies on the causative agent. *Can J Comp Med Vet Sci.* 31: 243-247

Lee J. H. (2003): Methicillin (Oxacillin)- resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol.* 69: 6489-6494

Lee J. H. (2006): Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Vet Microbiol.* 114: 155-159

Lemcke R., M. Buelte (2000): Occurrence of the vancomycin-resistant genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* and *vanC3* in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *Int J Food Microbiol.* 60: 185-194

Lemcke R. (2003): Isolierung und Feintypisierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) aus Geflügel- und Schweinefleisch. Dissertation an der Justus-Liebig-Universität, Gießen

Leonard F. C., B. K. Markey (2008): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A Review. *Vet J.* 175: 27-36

Lewis H. C., K. Molbak, C. Reese, F. M. Aarestrup, M. Selchau, M. Sorum, R. L. Skov (2008): Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 Infections in Humans, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 8: 1-15

Lilenbaum W., E. L. C. Nunes, M. A. I. Azeredo (1998): Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cat. *Lett Appl Microbiol* 27: 224-228

Loeffler A., A. K. Boag, J. Sung, J. A. Lindsay, L. Guardabassi, A. Dalsgaard, H. Smith, K. B. Stevens, D. H. Lloyd (2005): Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 56: 692-697

Loo V. G., S. Fenn, P. Lebel (2003): Comparison of different incubation times for the detection of MRSA by real-time PCR. *Inter Confer Antimicrobiol Agents Chemother.* 43: 195

Lowy F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 339: 520-532

Lu K., R. Asano, J. Davies (2004): Antimicrobial resistance gene delivery in animal feeds. *Emerg Infect Dis.* 10: 679-683

Mac K., H. Wichmann-Schauer, J. P. Peters, L. Ellerbroek (2003): Species identification and detection of Vancomycin resistance genes in enterococci of animal origin by multiplex PCR. *Int J Food Microbiol.* 88: 305-309

Marples R. R., J. F. Richardson, F. E. Newton (1990): Staphylococci as part of the normal flora of human skin. *Soc Aool Bacteriol Symo Ser.* 19: 93-99

Mayr. A. (Hrsg), M. Rolle, P. A. Bachmann, B. Gedek, H. Mahnel, H. Schels (1984): Micrococcaceae. In: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* Enke Verlag, Stuttgart. 5: 693-701

Maltezou H. C., H. Giamarellou (2006): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents.* 27: 87-98

McCarthy N. L., P. S. Sullivan, R. Gaynes, D. Rimland (2010): Health care-associated and community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A comparison of definitions. *Am J Infect Control.* 38: 600-606

McKessar S. J., A. M. Berry, J. M. Bell, J. D. Turnidge, J. C. Paton (2000): Genetic characterization of vanG, a novel Vancomycin resistance of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 3224-3228

McKinney T., V. K. Sharma, W. A. Craig, G. L. Archer (2001): Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and  $\beta$ -Lactamase regulators. *J Bacteriol.* 183: 6862-6868

Meemken D., C. Cuny, W. Witte, U. Eichler, R. Staudt, T. Blaha (2008): Zum Vorkommen von MRSA bei Schweinen und bei Menschen mit beruflicher Exposition zum Schwein- Erste Ergebnisse einer Studie in Nordwestdeutschland. *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 115: 132-139

Meemken D., T. Blaha (2009): Untersuchungen zum Vorkommen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) bei Haus- und Wildschweinen. *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 116. 297-301

Mitteilung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) (2007): Arbeitsbesprechung über die Zoonosen-Erhebungen zum Deutschen Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der RL2003/99/EG, hier: Protokoll und Nationaler Monitoringplan

Moellering R. C., D. J. Krogstadt (1979): Antibiotic resistance in enterococci. In: Schlessinger D. (Hrsg): Microbiology. American Society for Microbiology, Washington D. C.: 293-298

Mory F., A. Lozniewski, V. David, J. P. Carlier, L. Dubreuil, R. Leclercq (1998): Low-level Vancomycin resistance in *Clostridium innocuum*. J Clin Microbiol. 36: 1767-1768

Murchan S., M. E. Kaufmann, A. Deplano, R. de Ryck, M. Struelens, C. E. Zinn, V. Fusing, S. Salmenlinna, J. Vuopio-Varkila, N. El Sohl, C. Cuny, W. Witte, P. T. Tassios, N. Legakis, W. van Leeuwen, A. van Belkum, A. Vindel, I. Laconcha, J. Garaizar, S. Haeggman, B. Olsson-Liljequist, U. Ransjo, G. Coombes, B. Cookson (2003): Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J Clin Microbiol. 41: 1574-85.

Murray B. (1990). The life and times of the Enterococcus. Clin Microbiol Rev. 3: 46-65

Nagase N., A. Sasaki, K. Yamashita, A. Shimizu, Y. Wakita, S. Kitai, J. Kawano (2002): Isolation and species distribution of Staphylococci from animal and human skin. J Vet Med Sci. 64: 245-250

Naumann D., D. Helm, H. Labischinski (1990): Einsatzmöglichkeiten der FT-IR-Spektroskopie in Diagnostik und Epidemiologie, ein neuartiges Verfahren zur Charakterisierung pathogener Bakterien. Bundesgesundheitsbl. 33: 387-393

Newsom S. W. B. (2008): Ogston's coccus. J Hospital Infect. 70: 368-372

Nicolau D. P., M. N. Marangos, C. H. Nightingale, K. B. Patel, B. W. Cooper, R. Jr. Quintiliani, P. Courvalin, R. Quintiliani (1996): Efficacy of vancomycin and teicoplanin alone and in combination with streptomycin in experimental, low-level vancomycin-resistant, vanB-type *Enterococcus faecalis* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 40: 55-60



Niemeyer D. M., M. J. Pucci, J. A. Thanassi, V. K. Sharma, G. L. Archer (1996): Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 178: 5464-5471

Nilsson O., C. Greko, B. Bengtsson (2009): Environmental contamination by vancomycin resistant enterococci (VRE) in Swedish broiler production. *Acta Vet Scand.* 51: 49

Nemati M., K. Hermans, U. Lipinska, O. Denis, A. Deplano, M. Struelens, L. A. Devriese, F. Pasmans, F. Haesebrouck (2008): Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. *Antimicrob Agent Chemother.* 52: 3817-3819

Neuhaus B., N. Bocter, C. Bräulke, D. Heuck, W. Witte (2003): Methicillin-resistente Staphylokokken: In Altenheimen ebenso häufig vertreten wie in Krankenhäusern. *Dtsch Ärztebl.* 100: 2921-2922

Noble W. C., Z. Virani, R. G. A. Cree (1992): Co transfer of Vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 93: 195-198

Otto-Kuhn D., P. Tichaczek-Dischinger, J. Rau (2009): MRSA in Fleisch. Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle. 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Programm- und Abstract-Band

Panesso D., L. Abadia-Patino, N. Vanegas, P. E. Reynolds, P. Courvalin, C. A. Arias (2005): Transcriptional analysis of the *vanC* cluster from *Enterococcus gallinarum* strains with constitutive and inducible Vancomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 1060-1066

Pantosti A., M. Venditti (2009): What is MRSA. *Eur Repi J.* 34: 1190-1196

Perichon B., P. Reynolds, P. Courvalin (1997): VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 2016-2018

Patel R., J. R. Uhl, P. Kohner, M. K. Hopkins, J. M. Steckelberg, B. Kline, F. R. Cockerill (1998): DNA sequence variation with *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3* genes of clinical *Enterococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 202-205

Perri M. B., D. Vager, S. M. Donabedian, P. Bozigar, E. Hershberger, J. W. Chow, P. Bartlett, R. R. Muder, M. J. Zervos (2003): Epidemiology of enterococcal resistance in humans and animal farms. Abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 43: 138

Persoons D., S. van Hoorebeke, K. Hermans, P. Butaye, A. de Kruif, F. Haesebrouck, J. Dewulf (2009): Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Poultry. *Emerg Infect Dis.* 15: 853-856

Petermann S. (2006): Putenhaltung, Besatzdichte. In: Richter T. (Hrsg): Krankheitsursache Haltung. Enke Verlag, Stuttgart. 1: 209-210

Peters J. (2003): Antibiotikaresistenz von Enterokokken aus landwirtschaftlichen Nutztieren und Lebensmitteln tierischer Herkunft. Dissertation an der Freien Universität, Berlin

Piepersberg W. (2001): Endogenous antimicrobial molecules: An ecological perspective. In: M. Sussmann (Hrsg): *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press: 578

Pinho M. G., H. de Lencastre, A. Tomasz (2001): An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci.* 98: 10886-10891

Poeta P., H. Radhouani, R. Sargo, G. Igrejas (2008): In vitro activity of dalbavancin against enterococci isolates from wild animals, pets poultry and humans in Portugal. *J Basic Microbil.* 48: 526-528

Pomba C., H. Hasman, L. M. Cavaco, J. D. da Fonseca, F. M. Aarestrup (2009): First description of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC30 and CC398 from swine in Portugal. *Int J Antimicrob Agents.* 34: 193–194

Portillo A., C. Tenorio, M. Garcia, C. Martinez, R. Del Campo, F. Ruiz-Larrea, C. Torres (2003): Intestinal colonization by *vanA* or *vanB2*-containing enterococcal isolates of healthy animals in Spain. Abstract of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 43: 138

Poulsen A. B., R. Skov, L. V. Pallesen (2003): Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detectin Kit. *J Antimicrob Chemother.* 51: 419-421

Power E. G., Y. H. Abdulla, H. G. Talsania, W. Spice, S. Aathithan, G. French (1995): VanA genes in Vancomycin-resistant clinical of *Oerskovia turbata* and *Arcanobacterium* (*Corynebacterium*) *haemolyticum*. *J Antimicrob Chemother.* 36: 595-606

Poyart C., C. Pierre, G. Quesne, B. Pron, P. Berche, P. Trieu-Cuot (1997): Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: Characterization of a vanB transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 24-29

Pressel M. A., L. E. Fox, M. D. Apley, F. J. Simutis (2005): Vancomycin for multi-drug resistant *Enterococcus faecium* cholangiohepatitis in a cat. *J Feline Med Surg.* 7: 317-321

Pulz M. (2009): Maßnahmen zur Begrenzung der MRSA-Ausbreitung. *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 116: 301-306

Quintiliani R., P. Courvalin (1996): Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers Vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281. *Gene.* 172: 1-8

Rabbenstein F. (2008): Risikofaktoren für den Erwerb von Vancomycin-resistenten Enterokokken sowie deren Epidemiologie im Rahmen eines Ausbruchs in einer herzchirurgischen Abteilung. Dissertation an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg

Rau J., R. Perz, G. Klittich, M. Contzen (2009): Cereulidbildende präsumtive *Bacillus cereus* aus Lebensmitteln - Differenzierende Untersuchungen mittels kultureller Methoden, LC-MS/MS, PCR und Infrarotspektroskopie unter Berücksichtigung thermotoleranter Vertreter. *Berliner und Münchner Tierärztl Wochenschr.* 122: 25-36

Rice L. B. (2001): Emergence of Vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis.* 7: 183-187

Rich M., L. Roberts, A. M. Kearns (2005a): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. *Vet Microbiol.* 105: 313-314

Rich M. (2005b): Staphylococci in animals: Prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. British J Biomed Sci. 62: 98-105

Richter P. (1999): Isolation und Identifikation glykopeptidresistenter Enterokokkenspezies aus Mastgeflügel. Dissertation an der Freien Universität, Berlin

Robinson D. A., Enright M. C. (2004): Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect. 10: 92-97

Ruoff K. (2003): Aerococcus, Abiotrophia and other Infrequently Isolated Aerobic Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci. In: Murray P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover (Hrsg): Manual of Clinical Microbiology. 8: 434-444

Sahlstrom L., V. Rehbinder, A. Albihn, A. Aspan, B. Bengtsson (2009): Vancomycin resistant enterococci (VRE) in Swedish sewage sludge. ACTA Vet Scand. 51

Sakai Y., T. Tsukahara, K. Ushida (2003): Isolation of vancomycin-resistant enterococci from pigs in Japan. Animal Sci J. 74: 521-523

Salgado C. D., B. M. Farr, D. P. Calfee (2003): Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a meta-analysis of prevalence and risk factors. Clin Infect Dis. 36: 131-139

Sanford M. D., A. F. Widmar, M. J. Bale, R. N. Jones, R. P. Wenzel (1994): Efficient detection and long-term persistence of the carriage of Methicillin resistant Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis. 19: 1123-1128

Satake S., N. Clark, D. Rimland, F. Nolte, F. Tenover (1997): Detection of Vancomycin resistant enterococci in fecal samples by PCR. J Clin Microbiol. 35: 2325-2330

Schäfer M., T. R. Schneider, G. M. Sheldrick (1996): Crystal structure of vancomycin. Structure. 4: 1509-1515

Schleifer K. H., R. Kilpper-Baelz (1984): Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus revived name as Enterococcus faecalis new combination and Enterococcus faecium new combination. Int J Syst Bacteriol. 34: 31-34

Schleifer K. H., R. Kilpper-Baelz (1987): Molecular and chemotaxonomie approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci. A review. *Syst Appl Microbiol.* 10: 1-19

Schneider-Lindner V., J. A. Delaney, S. Dial, A. Dascal, S. Suissa (2007): Antimicrobial drugs and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 13: 994-1000

Schwarz S., K. Kadlec, B. Strommenger (2008): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 61: 282-285

Selbitz H.-J. (2007): Micrococcaceae. In: Mayr A. (Hrsg): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* Enke Verlag, Stuttgart. 8: 479-491

Seo K. S., J. Y. Lim, H. S. Yoo, W. K. Bae, Y. H. Park (2005): Comparison of vancomycin-resistant enterococci isolates from human, poultry and pigs in Korea. *Vet Microbiol.* 106: 225-233

Shopsin B., M. Gomez, S. O. Montgomery, D. H. Smith, M. Waddington, D. E. Dodge, D. A. Bost, M. Riehman, S. Naidich, B. N. Kreiswirth (1999): Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 37: 3556-3563

Simjee S., D. G. White, P. F. McDermott, D. D. Wagner, M. J. Zervos, S. M. Donabedian, L. L. English, J. R. Hayes, R. D. Walker (2002): Characterization of Tn1546 in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Canine Urinary Tract Infections: Evidence of Gene Exchange between Human and Animal Enterococci. *J Clin Microbiol.* 40: 4659-4665

Simon A., N. Gröger, S. Engelhart, G. Molitor, M. Exner, U. Bode, G. Fleischhack (2004): Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) - Übersicht zu Bedeutung, Prävention und Management in der Pädiatrie. *Hyg Med.* 29: 259-275

Simonsen G., H. Haaheim, K. H. Dahl, H. Kruse, A. Lovseth, O. Olsvik, A. Sundsfjord (1998): Transmission of VanA-type vancomycin-resistant enterococci and vanA resistance elements between chicken and humans at avoparcin-exposed farms. *Microbial Drug Resist.* 4: 313-318.

Sood S., M. Malhotra, B. K. Das, A. Kapil (2008): Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Resist.* 128: 111-121

Spera R. V., B. F. Farber (1992): Multiply-resistant *Enterococcus faecium*. The nosocomial pathogen of the 1990s. *JAMA.* 268: 2563-2564

Spoehr M., J. Rau, A. Friedrich, G. Klittich, A. Fetsch, J.-A. Hammerl, B.-A. Tenhagen (2010): Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in Southwest Germany. *Zoonoses Public Health.* 10: 1863-1874

Stiles M. E., N. W. Ramji, L.-K. Ng, D. C. Paradis (1978): Incidence and relationship of group D streptococci with other indicator organisms in meats. *Can J Microbiol.* 24: 1502-1508

Sting R., M. Stermann (2008): Duplex real-time PCR assay for rapid detection of virulence genes in *E. coli* isolated from post-weaning pigs and calves with diarrhoea. *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 6: 231-238

Stobberingh E., A. van den Bogaard, N. London, C. Driessen, J. Top, R. Willems (1999): Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of the Netherlands: Evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 2215-2221

Stock I. (2007): Koagulase-negative Staphylokokken als multiresistente Krankheitserreger. *Arzneimittelther.* 25: 443-56

Strommenger B., C. Kehrenberg, C. Kettlitz, C. Cuny, J. Verspohl, W. Witte, S. Schwarz (2006): Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *J Antimicrob Chemother.* 57: 561-465

Teixeira L. M., R. R. Facklam (2003): Enterococcus. In: Murray P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover (Hrsg): *Manual of Clinical Microbiology.* 8: 422-433

Tenhagen B.-A., A. Fetsch, J. Bräunig, A. Käsbohrer (2008): Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Nutztieren - Abschätzung der Gefährdung des Menschen. *Dtsch Tierärztebl.* 9: 1177-1182

Tenhagen B.-A., A. Fetsch, A. Käsbohrer, J. Bräunig, B. Appel (2009): Prävalenz von MRSA bei landwirtschaftlichen Nutztieren und in Lebensmittel. Dtsch Tierärztl Wochenschr. 116: 307-311

Tenover F. C. (2008): Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: A perfect but geographically limited storm? Clin Infect Dis. 46: 675-677

Thompson T. L., E. H. Marth (1986): Changes in Parmesan cheese during ripening: Microflora coliforms enterococci, anaerobes, probionibacteria and staphylococci. Milchwissenschaft. 41: 201-205

Thrusfield M., C. Ortega, I. De Blas, J. P. Noordhuizen, K. Frankena (2001): Win Episcopo 2.0: Improved epidemiological software for veterinary medicine. Vet Rec. 148: 567-572

Tiemersma E. W., S. Bronzwaer, O. Lytikainen, J. E. Degener, P. Schrijnemakers, N. Bruinsma, J. Monen, W. Witte, H. Grundmann (2004): Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999-2002. Emerg Infect Dis. 10: 1627-1634

Top J., R. Willems, M. Bonten (2008): Emergence of CC17 Enterococcus faecium: from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunol Med Microbiol. 52: 297-308

Trindade P. A., J. A. McCulloch, G. A. Oliveira, E. M. Mamizuka (2003): Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. Braz J Infect Dis. 7: 32-43

Tsakalidou E., E. Manolopoulou, V. Tsilibari, M. Georgalaki, G. Kalantzopoulos (1993): Esterolytic activities of Enterococcus durans and Enterococcus faecium strains isolated from Greek cheeses. Netherl Milk Dairy J. 47: 145-150

Uttley A. H. C., C. H. Collins, J. Naidoo, R. C. George (1988): Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 2: 57-58

Van den Broek I. V. F., B. A. G. van Cleef, A. Haenen, E. M. Broens, P. J. van der Wolf, M. J. M. van den Broek, X. W. Huijsdens, J. A. J. Kluytmans, A. W. van de Giessen, E. W. Tiemersma (2008): Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in people living and working in pig farms. Epidemiol Infect. 10: 1-9

Van Duijkeren E., M. D. Jansen, S. C. Flemming, H. de Neeling, J. A. Wagenaar, A. H. W. Schoormans, A. van Nes, A. C. Fluit (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. *Emerg Infect Dis.* 13: 1408-1410

Van Duijkeren E., R. Ikawaty, M. J. Broekhuizen-Stins, M. D. Jansen, E. C. Spalburg, A. J. de Neeling, J. G. Allaart, A. van Nes, J. A. Wagenaar, A. C. Fluit (2008): Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Vet Microbiol.* 126: 383-389

Van Loo I., X. Huijsdens, E. Tiemersma, A. de Neeling, N. van de Sandre-Bruinsma, D. Beaujean, A. Voss, J. Kluytmans (2007): Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Diss.* 13: 1834-1839

Virgin J. E., T. M. Van Slyke, J. E. Lombard, R. N. Zadoks (2009): Short communication: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection in US bulk tank milk. *J Dairy Sci.* 92: 4988-4991

Walther B. (2007): Molekulare Epidemiologie Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) in der Veterinärmedizin. Dissertation an der Freien Universität, Berlin

Walther B., L. H. Wieler, A. W. Friedrich, A. M. Hanssen, B. Kohn, L. Brurmberg, A. Luebke-Becker (2008): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Vet Microbiol.* 127: 171-178

Walther B., S. Monecke, C. Ruscher, A. W. Friedrich, R. Ehricht, P. Slickers, A. Soba, C. G. Wleklinski, L. H. Wieler, A. Lubke-Becker (2009): Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 47: 704-719

Weese J. S., J. Rousseau, J. L. Traub-Dargatz, B. M. Willey, A. J. McGeer, D. E. Low (2005): Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. *J Am Vet Med Assoc.* 266: 580-583

Weese J. S., M. Faires, J. Rousseau, A. M. E. Bersenas, K. A. Mathews (2007): Cluster of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a small animal intensive care unit. *J Am Vet Med Assoc.* 231: 1361-1364



Weigt U., E. Grunert (1984): Mastitiden. In: Grunert E. (Hrsg.): *Buatrik Band I Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung*. M. & H. Schaper, Hannover, 4: 45-66

Wellinghausen N., D. Siegel, S. Gebert, J. Winter (2009): Rapid detection of *Staphylococcus aureus* bacteremia and methicillin resistance by real-time PCR in whole blood samples. *Euro J Clin Microbiol Infect Dis*. 28

Wells C. L., B. A. Juni, S. B. Cameron, K. R. Mason, D. L. Dunn, P. Ferrieri, F. S. Rhame (1995): Stool carriage, clinical isolation, and mortality during an outbreak of Vancomycin-resistant enterococci in hospitalised medical and/or surgical patients. *Clin Infect Dis*. 21: 45-50

Werner G., I. Klare, J. Hübner, W. Kern, W. Witte (2008a): Vancomycin-resistente Enterokokken. *Chemother J*. 17: 183-193

Werner G., T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K. G. Kristinsson, R. Leclercq, C. H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L. V. Peixe, E. Saq dowy, G. S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R. J. Willems, W. Witte, N. Woodford (2008b): Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill*. 13

Werner G., I. Klare, C. Fleige, W. Witte (2008c): Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wild clonal dissemination of vancomycin-resistant enterococci and horizontal spread of vanA clusters. *Int J Med Microbiol*. 298: 515-527

Wewers K. (2008): Molekulare Charakterisierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* mittels spa-Typisierung. Dissertation an der Universität Marburg

Willems J. L., J. Top, N. van den Braak, A. van Belkum, H. Endtz, D. Mevius, E. Stobberingh A. van den Bogaard, J. D. van Embden (2000): Host Specificity of Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis*. 182: 816-823

Willems R. J. L., M. J. M. Bonten (2007): Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis*. 20: 384-390

Witte W., Klare I. (1995): Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* outside hospitals: A commentary. *Microbial Drug Resist-mech Epidemiol Dis.* 1: 259-263

Witte W., M. Kresken, C. Bräulke, C. Cuny (1997): Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 3: 414-422

Witte W., I. Klare, G. Werner (1998): Glykopeptid-Resistenz bei Enterokokken. *Chemother J.* 7: 50-52

Witte W., C. Cuny, I. Klare, U. Nübel, B. Strommenger, G. Werner (2008): Emergence and spread of antibiotic-resistant gram-positive bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 298: 365-377

Witte W. (2009): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: What do we need to know? *Clin Microbiol Infect.* 15: 17-25

Wittwer C. T., K. M. Ririe, R. V. Andrew, D. A. David, R. A. Gundry, J. U. Balis (1997): The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniq.* 22: 176-181

Woodford N., D. Morrison, A. P. Johnson, A. C. Bateman, J. G. M. Hasting, T. S. J. Elliott, B. Cookson (1995): Plasmid-mediated vanB glycopeptide resistance in enterococci. *Microbial Drug Resist-mech Epidemiol Dis.* 1: 235-240

Wu S., C. Piscitelli, H. de Lencastre, A. Tomasz (1996): Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microbiol Drug Resist.* 2: 435-441

Wu D. J., Q. Wang, Y. H. Yang, W. J. Geng, Q. Wang, S. J. E. Yu, K. H. Yao, L. Yuan, X. Z. Shen (2010): Epidemiology and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from skin/soft tissue infections in a children's hospital in Beijing, China. *Diagnost Microbiol Infect Dis.* 67: 1-8

Zapun A., C. Contreras-Martel, T. Vernet (2008): Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 32: 361-385

Zhang K., J. A. McClure, S. Elsayed, T. Louie, J. M. Conly (2005): Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 43: 5026-5033

Zhang K., J. A. McClure, S. Elsayed, J. M. Conly (2009): Novel Staphylococcal Cassette Chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am Soci Microbiol.* 53: 531-540

Zhu W., N. C. Clark, L. K. McDougal, J. Hageman, L. C. McDonald, J. B. Patel (2008): Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like vanA plasmids in Michigan. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 452-457

## Internetadressen

<http://www.animal-health-online.de>

[www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)

[www.nrz-hygiene.de](http://www.nrz-hygiene.de)

<http://www.who.int/en/>

[www.mlst.net](http://www.mlst.net)

<http://www.rivm.nl/earss>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[www.statistik.baden-wuerttemberg.de](http://www.statistik.baden-wuerttemberg.de)

<http://align.genome.jp/>

[www.efsa.europa.eu/de](http://www.efsa.europa.eu/de)

[www.fve.org/news/newsletter.php](http://www.fve.org/news/newsletter.php)

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=31957>

## Publikationsverzeichnis

Richter A., R. Sting, J. Rau, C. Popp, A. Fetsch, H. M. Hafez (2010): Investigation on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat turkey flocks. 8<sup>th</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin, Germany, Proc.: 27-30

Richter A., R. Sting, A. Fetsch, C. Popp, H. M. Hafez (2010): Untersuchungen über das Vorkommen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) bei Mastputen. 79. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten, Hannover, Germany, Proc.: 17-27

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hafez danke ich sehr für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Unterstützung während der Planung, Durchführung und Anfertigung der Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Veterinärdirektor Dr. Sting für die allzeit freundliche, zuverlässige und geduldige Betreuung der Arbeit. Seine außergewöhnliche Unterstützung hat meine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten täglich gefördert.

Herrn Prof. Dr. Rösler und Herrn Prof. Dr. Alter danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit. Der Grimminger-Stiftung für Zoonosen-Forschung danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei der Leiterin des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes Stuttgart, Frau Leitende Chemiedirektorin Roth für die freundliche Unterstützung und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes. Ebenso bedanke ich mich herzlich bei den Mitarbeitern der Bakteriologie, der Nährbodenküche und bei Frau Dr. Ackermann sowie bei allen Mitarbeitern des CVUA Stuttgart, für die freundliche Hilfe, das gute Arbeitsklima und die interessante und lehrreiche Zeit.

Ich bedanke mich bei dem Standortkoordinator der Tiergesundheitsdienste der Tierseuchenkasse Baden-Württemberg, Herrn Veterinärdirektor Dr. Lohner und allen Mitarbeitern für die großzügige Unterstützung, bei Frau Dr. Popp zusätzlich für die Auswahl der Mastputenbetriebe und die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei der Probenentnahme.

Bei allen Mitarbeitern des Nationalen Referenzlabors für Koagulase positive Staphylokokken incl. *S. aureus* im Bundesinstitut für Risikobewertung, insbesondere bei Frau Dr. Fetsch und Herrn PD Dr. Tenhagen, bedanke ich mich für die molekulare Typisierung der MRS-Isolate und die hilfreichen Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

Den Landwirten sowie deren Familien einen herzlichen Dank für die Teilnahme an diesem Projekt.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Heike Rau und Kira Stiehr für die tolle Unterstützung bei der Gestaltung des Layouts und der Korrektur.

Bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, bedanke ich mich für die liebevolle Unterstützung, die sie mir während des Studiums und der Doktorarbeit entgegen gebracht haben. Sie sind mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Mein ganz besonderer Dank gilt Rainer Färber für die Unterstützung, Rücksichtnahme und Zuversicht in dieser anstrengenden Zeit.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Süßen, den 22.11.2011      Agnes Richter