

Aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Vergleichende epidemiologische
und molekularbiologische Untersuchung von
Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus (MRSA)
aus Nutztierhaltungen und deren Umgebung**

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

vorgelegt von
Karolin Krüger
Tierärztin aus Lutherstadt Wittenberg

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4102

Aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Vergleichende epidemiologische und molekularbiologische Untersuchung von
Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) aus Nutztierhaltungen und
deren Umgebung**

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

vorgelegt von
Karolin Krüger
Tierärztin
aus Lutherstadt Wittenberg

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4102

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Diana Meemken

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

methicillin-resistent staphylococcus aureus; pig finishing; poultry finishing; drug resistance; genetic analysis; PFGE; multilocus sequence typing; MALDI-TOF; polymerase chain reaction; epidemiology

Tag der Promotion: 29.04.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-976-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

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 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für Ida

und in Gedenken an meine Oma Lydia

Inhalt

ABBILDUNGSGSVEREICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 Charakteristik von <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.1.1 Virulenzassoziierte Faktoren von <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.2 Resistenzen von <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.2.1 Allgemeine Problematik der Antibiotikaresistenz.....	6
2.1.2.2 Resistenz gegen β -Lactam Antibiotika.....	6
2.1.2.3 Resistenzen gegen nicht- β -Lactam Antibiotika.....	8
2.2 Nachweismethoden von MRSA.....	11
2.2.1 Kultureller Nachweis.....	11
2.2.2 Molekularbiologische Untersuchungsverfahren zur epidemiologischen Differenzierung von MRSA.....	11
2.2.2.1 Nachweis des <i>mecA</i> -Gens.....	11
2.2.2.2 SCC <i>mec</i> -Sequenzierung.....	12
2.2.2.3 <i>spa</i> -Typisierung.....	12
2.2.2.4 Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	13
2.2.2.5 PCR zur Bestätigung der Zugehörigkeit zum klonalen Komplex CC398.....	14
2.2.2.6 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	14
2.2.2.7 DNA-Microarray-Technologie.....	15
2.2.2.8 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS).....	16
2.3 Epidemiologie von MRSA.....	17
2.3.1 Vorkommen und Bedeutung von MRSA bei Tieren.....	17
2.3.1.1 MRSA bei Schweinen.....	17

2.3.1.2	MRSA bei Geflügel.....	19
2.3.1.3	MRSA bei Wiederkäuer.....	21
2.3.1.4	MRSA bei Companion Animals.....	22
2.3.2	Vorkommen und Bedeutung von MRSA beim Menschen.....	23
2.3.2.1	„Hospital-assoziierte“ MRSA (ha-MRSA).....	23
2.3.2.2	„Community-assoziierte“ MRSA (ca-MRSA).....	23
2.3.2.3	„Livestock-assoziierte“ MRSA (la-MRSA).....	24
2.4	Bedeutung und Vorkommen von MRSA in Umgebungsproben.....	25
3	MATERIAL.....	27
3.1	Herkunft der Isolate.....	27
3.2	Geräte.....	27
3.3	Chemikalien.....	28
3.4	Fertige Reaktionssystem (Kits).....	30
3.5	Nährmedien.....	30
3.6	Lösungen.....	30
3.7	Primer zur PCR Amplifikation.....	33
3.8	<i>Staphylococcus aureus</i> Referenzstämme.....	34
3.8.1	Referenzstandard NCTC 8325.....	34
3.8.2	MRSA Kontrollstamm 08S00699.....	34
3.9	Verwendete Computerprogramme.....	34
4	METHODEN.....	35
4.1	Probenahme in den Tierbeständen – Longitudinalstudie.....	35
4.1.1	Probenahmeplan.....	35
4.1.2	Probenahme in den Beständen.....	35
4.1.3	Bearbeitung der Proben.....	36
4.1.4	Auswahl der Isolate.....	37
4.2	Molekularbiologische Untersuchungsverfahren.....	38
4.2.1	DNA-Extraktion - asservierte Isolate.....	38

4.2.2	<i>spa</i> -Typisierung.....	38
4.2.2.1	Durchführung der PCR.....	38
4.2.2.2	Gelelektrophorese und Dokumentation.....	39
4.2.2.3	DNA-Sequenzanalyse.....	39
4.2.3	PCR zur Bestätigung der Zugehörigkeit zum Clonal Complex (CC) 398.....	39
4.2.3.1	Durchführung der PCR.....	39
4.2.4	Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	40
4.2.4.1	Durchführung der PCR.....	41
4.2.5	Makrorestriktionsanalyse mit anschließender Pulsfeldgelelektrophorese für MRSA ST398.....	42
4.2.6	Microarray-Analyse.....	44
4.2.7	Differenzierung der Isolate durch MALDI-TOF-MS.....	45
5	ERGEBNISSE.....	51
5.1	<i>spa</i> -Typisierung.....	51
5.1.1	Geflügelmastbestände.....	52
5.1.2	Schweinebestände.....	54
5.2	Zugehörigkeit der MRSA-Isolate zum Clonal Complex 398.....	56
5.3	Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	56
5.4	Stammtypisierung ausgewählter MRSA-Isolate mittels Makrorestriktionsanalyse.....	57
5.4.1	Genotypische Charakterisierung und Clusteranalyse.....	58
5.5	DNA-Microarray Analyse.....	65
5.6	Proteinprofilcharakterisierung mittels MALDI-TOF-MS.....	70
5.6.1	Composite Correlation Index.....	71
5.6.2	Clusteranalyse zum Vergleich von Bakterienisolaten auf Proteinebene.....	75
6	DISKUSSION.....	81
6.1	Untersuchungen zur Emission von MRSA aus Nutztierhaltungen.....	81
6.1.1	<i>Spa</i> -Typisierung - und Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	82

6.1.2	Analyse der klonalen Verwandtschaft.....	85
6.2	Einschätzung der Tenazität emittierter und deponierter MRSA in der Stallumgebung von Schweinebeständen unter verschiedenen Umweltbedingungen.....	89
6.3	Anwendbarkeit unterschiedlicher Verfahren zur molekularbiologischen Typisierung.....	90
6.4	Relevante Pathogenitätsfaktor- und Antibiotikaresistenz-Genen ausgewählter MRSA-Isolate.....	92
6.5	Anwendbarkeit der <i>Cfr9I</i> -Makrorestriktionsanalyse in der MRSA-Typisierung im Vergleich zur MALDI-TOF-MS.....	95
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
8	SUMMARY.....	101
9	LITERATURVERZICHNIS.....	103
10	ANHANG.....	125
11	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	136
12	DANKSAGUNG.....	137
13	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grafische Darstellung der einzelnen Präparationsschritte für die MALDI-TOF-MS Messung.....	45
Abbildung 2: Datenauswertung mittels FlexAnalysis 3.0 Software.....	47
Abbildung 3: Auswertungsschema der Biotyper 3.0 Software.....	47
Abbildung 4: Correlation-Matrix ermittelter CCI-Werte.....	48
Abbildung 5: Verteilung der <i>spa</i> -Typen unter den verschiedenen Probenarten aus dem Innen- und Außenbereich der Putenmastbestände.....	53
Abbildung 6: Verteilung der <i>spa</i> -Typen unter den verschiedenen Proben aus dem Innen- und Außenbereich der Masthähnchenbestände.....	55
Abbildung 7: Verteilung der <i>spa</i> -Typen unter den verschiedenen Probenarten aus dem Innen- und Außenbereich der Schweinebestände.....	55
Abbildung 8: 1. Beispiel der Fragmentauftrennung mittels PFGE nach Makrorestriktion der chromosomalen DNA mit dem Restriktionsenzym <i>Cfr9I</i>	57
Abbildung 9: 2. Beispiel der Fragmentauftrennung mittels PFGE nach Makrorestriktion der chromosomalen DNA mit dem Restriktionsenzym <i>Cfr9I</i>	58
Abbildung 10: Dendrogramm der 34 MRSA-Isolate aus Masthähnchenbeständen M1 und M2 basierend auf den Cfr9I-Restriktionsmustern.....	59
Abbildung 11: Dendrogramm der 30 MRSA-Isolate aus Putenmastbeständen (P1, P2) basierend auf den Cfr9I-Restriktionsmustern.....	61
Abbildung 12: Dendrogramm der 60 MRSA-Isolate aus Schweinebeständen basierend auf den Cfr9I-Restriktionsmustern.....	63
Abbildung 13: CCI-Werte ausgewählter MRSA-Isolate als Rohdatensatz.....	72
Abbildung 14: Farbliche Darstellung des Composite Correlation Index der 34 Massenspektren ausgewählter MRSA-Isolate.....	75
Abbildung 15: Clusteranalyse der MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren mittels PAST-Software (n=204).....	78
Abbildung 16: Clusteranalyse der MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren mittels PAST-Software (n=34).....	79
Abbildung 17: Dendrogramm der 34 ausgewählten MRSA-Isolate aus M1 und M2 basierend auf den Cfr9I-Restriktionsmustern.....	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht virulenzassoziierter Faktoren von <i>Staphylococcus aureus</i>	4
Tabelle 2: Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer.....	33
Tabelle 3: Pipettierschema für den PCR-Reaktionsansatz zur <i>spa</i> -Typisierung.....	38
Tabelle 4: Temperatur-Zeit-Programm zur Amplifikation des <i>spa</i> -Gens.....	39
Tabelle 5: Pipettierschema für den PCR-Reaktionsansatz zur Bestätigung des CC398...	40
Tabelle 6: Temperatur-Zeit-Programm zur Amplifikation des <i>sau1-hsdS1</i> -Gens.....	40
Tabelle 7: Pipettierschema für den PCR-Reaktionsansatz zur MLST.....	41
Tabelle 8: Temperatur-Zeit-Programm zur Amplifikation der sieben Housekeeping- Gene <i>arcC</i> , <i>aroE</i> , <i>glpF</i> , <i>gmk</i> , <i>tpi</i> sowie <i>yqil</i>	41
Tabelle 9: PFGE-Laufbedingungen für MRSA ST398.....	44
Tabelle 10: Ermittelte Ähnlichkeitswerte für die Gruppe A.....	50
Tabelle 11: Ermittelte Ähnlichkeitswerte für die Gruppe B.....	50
Tabelle 12: Übersicht ermittelter <i>spa</i> -Typen und deren Repeatprofile.....	51
Tabelle 13: Vorkommen und prozentuale Verteilung ermittelter <i>spa</i> -Typen aus Putenmastbeständen.....	52
Tabelle 14: Vorkommen und prozentuale Verteilung ermittelter <i>spa</i> -Typen aus Masthähnchenbeständen.....	53
Tabelle 15: Vorkommen und prozentuale Verteilung ermittelter <i>spa</i> -Typen aus Schweinezucht- und Schweinemastbeständen.....	55
Tabelle 16: Übersicht CC 398 assoziierter <i>spa</i> -Typen aus verschiedenen Tierbeständen.....	56
Tabelle 17: Probenschlüssel der in Tabelle 16 dargestellten MRSA-Isolate aus den untersuchten Geflügel- und Schweinebeständen.....	66
Tabelle 18: Ergebnisse der Microarray-Analyse.....	67
Tabelle 19: Probenschlüssel der in Abbildung 13 – 17 dargestellten MRSA-Isolate aus Masthähnchenbestand M1 und M2.....	71

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
BfR	Bundeseinstitut für Risikobewertung
BMELV	Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bp	Basenpaar
BURP	Based Upon Repeat Pattern
BURST	Based Upon Related Sequence Types
ca-MRSA	community-assoziierte MRSA
CC	klonaler Komplex
CCI	Composite Correlation Index
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic Acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
et al.	et alii (und andere)
EU	Europäische Union
g	Gramm
h	Stunde
ha-MRSA	hospital-assoziierte MRSA
HCl	Salzsäure
kb	Kilobase
KNS	koagulase-negative Staphylokokken
kV	Kilovolt
l/min	Liter pro Minute
la-MRSA	livestock-assoziierte MRSA
M	Molar
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
M1/M2	Masthähnchenbestand 1 und 2
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
mg/l	Miligramm pro Liter
ml	Milliliter
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MSP	Main Spectra Library
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCTC	National Collection of Type Cultures
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
NRZ	Nationales Referenzzentrum

ns	Nanosekunde
OD	Optische Dichte
P1/P2	Putenmastbestand 1 und 2
PBP2a	Penicillin-bindendes Protein 2a
PBPs	Penicillin-bindende Proteine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxonium-Ionenkonzentration
pmol/μl	Pikomol pro Mikroliter
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S1/S2/S3	Schweinebestand 1, 2 und 3
SCC <i>mec</i>	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
SE	Staphylokokken-Enterotoxine
spa	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A
ST	Sequenztyp
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/cm	Volt pro Zentimeter
WGS	Whole Genome Sequencing

1 Einleitung

Die Diskussion bezüglich des Auftretens von antibiotikaresistenten Keimen in Human- und Veterinärmedizin geriet in den letzten Jahren vermehrt in den gesellschaftskritischen Fokus. Schlagzeilen wie „Antibiotika-Resistenz - die Superseuche der Zukunft“ oder „Massentierhaltung: Kann man trotz MRSA noch Fleisch essen?“ weckten nicht nur das Interesse des Verbrauchers, sondern verunsicherten diesen zugleich (ETTEL, 2015; POLKE-MAJEWSKI, 2016).

Das Kurzwort MRSA steht dabei für Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*. MRSA wurde in der Vergangenheit vorrangig mit stationären Einrichtungen des Gesundheitswesens in Verbindung gebracht und etablierte sich unter der Bezeichnung Krankenhaus- bzw. Hospitalismuskern. Jedoch änderte sich dieser Blickwinkel, nachdem der Erreger bei Personen isoliert wurde, die keinen vorherigen Krankenhausaufenthalt aufwiesen und demnach eine sogenannte community-assoziierte MRSA (ca-MRSA) Infektion erwarben. Tiermedizinische Einrichtungen stellen aus epidemiologischer Sicht ein weiteres wichtiges Reservoir für Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* dar, wobei sich Berichte bezüglich MRSA-vermittelter Infektionsprozesse besonders in Kleintier- bzw. Pferdekliniken in den vergangenen Jahren häuften. Analog dazu wiesen zahlreiche nationale und internationale Studien das Vorkommen von MRSA der klonalen Linie ST398 in der Landwirtschaft nach und zwar bei Nutztieren wie Schweinen, Rindern oder Wirtschaftsgeflügel. Das Robert Koch-Institut weist daraufhin, dass in ca. 50 % aller konventionell geführten Schweinemastanlagen in Deutschland, Tiere nasal mit MRSA ST398 besiedelt sind. Bei unmittelbar beruflich exponierten Menschen wie Landwirten oder Tierärzten ist das Risiko einer MRSA-Kolonisierung nachweislich um das 138-fache erhöht als bei nicht exponierten Menschen im gleichen Umfeld (CUNY et al., 2009; CUNY et al., 2013).

Auf positive Nachweise von MRSA, auch in der direkten Haltungsumwelt von Nutztieren, folgten Untersuchungen bezüglich einer möglichen Emission des Keims aus dem Tierstall in die Umgebung. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, ausgewählte MRSA-Isolate aus Schweine- und Geflügelmastbeständen, darunter Proben von Tieren, der Tierumgebung sowie der Umwelt weiterführend zu charakterisieren. Neben genotypischen Verfahren wie Makrorestriktionsanalyse oder Microarray-Technologie wird zusätzlich eine massenspektrometrische Analyse mittels Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) durchgeführt. In diesem Zusammenhang soll der Nachweis eines aerogenen Erregeraustauschs aus dem Tierstall in die direkte Stallumgebung erbracht und epidemiologische Zusammenhänge zwischen Isolaten verschiedener Herkunft

beschrieben werden. Darüber hinaus soll eine erste Einschätzung bezüglich der Umweltenazität sowie der Pathogenität emittierter und deponierter MRSA getroffen werden. Die generierten Daten aus MALDI-TOF-MS und Makrorestriktionsanalyse werden in einer abschließenden Untersuchung miteinander verglichen. Im Detail erfolgt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den parallel durchgeführten Clusteranalysen mit dem Ziel, mögliche Ähnlichkeiten bzw. Diversitäten zu identifizieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Charakteristik von *Staphylococcus aureus*

Bei der zur Familie der *Staphylococcaceae* (vorher *Micrococcaceae*) gehörenden Gattung *Staphylococcus* handelt es sich um nicht-sporenbildende, in der Gramfärbung positive kokkoide Bakterien (VALENTIN-WEIGAND, 2015). Im mikroskopischen Bild erscheinen die immobilen 0,5-1,5 µm großen Staphylokokken in einer unregelmäßigen haufenartigen Anordnung (gr. staphylé, Traube), aber auch vereinzelt, paarweise, in Tetraden oder kurzen Ketten (BECKER et al., 2015). Im Unterschied zur Gattung *Streptococcus* bilden Staphylokokken das Enzym Katalase, welches die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser katalysiert. Die fakultativen Anaerobier werden auf nicht-selektiven Nährmedien wie beispielsweise Schafblutagar kultiviert. Nach 18 – 24-stündiger Inkubation bei 36 ± 1 °C zeigen sich gelbe bis goldgelbe oder auch weiß pigmentierte mittelgroße Kolonien mit verschiedenartigem Hämolyseverhalten (BECKER & PETERS, 2009). Gegenüber seiner Umwelt zeigt *Staphylococcus aureus* eine besonders hohe Widerstandsfähigkeit. So toleriert er hohe Kochsalzkonzentrationen von bis zu 10 % und Hitzeeinwirkungen von bis zu 60 °C über 30 min und wird erst bei höheren Temperaturen und nach langanhaltender Exposition abgetötet. Des Weiteren ist er resistent gegenüber Austrocknung und lässt sich aus Staub noch nach Monaten isolieren (GROß, 2013; GATERMANN, 2016).

Eines der wichtigsten Hauptmerkmale von *S. aureus*, ist die Fähigkeit der Produktion von Plasmakoagulase, die ähnlich dem Thrombin die Polymerisation von Fibrinogen zu Fibrin bewirkt. Der entstandene Fibrinwall fungiert dann als Schutzbarriere gegenüber der zellulären Immunabwehr und fördert so die Ausbreitung der Bakterien in den Organismus. Auf Grund dieses pathogenen Faktors erfolgt eine klinische Differenzierung in koagulasepositive (z.B. *S. aureus*, *S. intermedius*) und koagulasenegative Staphylokokken (z.B. *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*).

2.1.1 Virulenzassoziierte Faktoren von *Staphylococcus aureus*

Das pathogene Verhalten von *S. aureus* beruht auf dem Expressieren von virulenzassoziierten Faktoren, die entweder Zellwand gebunden sind oder zum anderen in die Umgebung sezerniert werden können. Dazu gehören Enzyme und Zytotoxine wie Hämolsine (α , β , γ , δ), Nukleasen, Proteasen, Lipasen, Hyaluronidasen sowie Kollagenasen, die von nahezu allen Stämmen produziert werden und beispielsweise befallenes Wirtsgewebe in Nährstoffe für das bakterielle Wachstum umwandeln. Leukozidine, Exfoliative Toxine, Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 oder diverse Staphylokokken-Enterotoxine werden hingegen nur von einigen Stämmen ausgebildet. Jedes dieser Toxine ist in der Lage die zelluläre Immunantwort herabzusetzen und durch andere biologische Wirkungsweisen den Organismus zu schädigen (DINGES et al., 2000). Eine Übersicht der Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus* ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht virulenzassoziiierter Faktoren von *Staphylococcus aureus*

Oberflächenassoziierte Virulenzfaktoren	funktionelle Wirkungsweise
Protein A	- bindet an Fc-Stück von Immunglobulin G (IgG) und verhindert dadurch Bindung von IgG an den Fc-Rezeptor von Makrophagen → Behinderung der Opsionierung; Hemmung der Phagozytose
Clumping Factor	- wirkt als Rezeptor für Fibrinogen → vermittelt Bindung von <i>Staphylococcus aureus</i> an Fibrinogen in verletzten Geweben sowie auf medizinischen Implantaten oder Kathetern
Fibronectin-bindendes Protein	- Glykoprotein der extrazellulären Matrix → vermittelt Adhärenz und Invasion
Kollagen-bindendes Protein	- Bindung an das Hauptstrukturprotein Kollagen z.B. zur Adhärenz an Knorpelzellen
Kapsel	- Phagozytoseschutz; Beteiligung an Biofilmbildung
Nicht-kovalent gebundene oberflächenassoziierte Virulenzfaktoren	funktionelle Wirkungsweise
Plasmakoagulase	- bewirkt Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin → Ausbildung eines Fibrinschutzwalles
Elastin-bindendes Protein	- bindet an elastische Fasern der extrazellulären Matrix → Gewebeadhärenz
Staphylokinase (Fibrinolysin)	- Enzym mit Fibrinlysin-Aktivität, das die ausgebildete Fibrinkapsel lysiert → Ausbreitung des Erregers im infizierten Organismus

sezernierte Virulenzfaktoren	funktionelle Wirkungsweise
Hämolysine (α , β , γ , δ)	<ul style="list-style-type: none"> - membranschädigende Toxine mit verschiedenartigen Wirkungsmechanismen - α-Toxin: Ausbildung von Membranporen an den Zielzellen - → Endothelzellschädigung, dermatonekrotische Wirkung, Hämolyse - β-Toxin: magnesiumabhängige Sphingomyelinase → zytotoxisch für Erythrozyten und Monozyten - γ-Toxin: Zweikomponenten-Hämolysin - → stark hämolysierend und zytotoxisch (Leukozyten) - δ-Toxin: Polypeptid aus 26 Aminosäuren - → durch sein zytolytisches Potential schädigend für eine Vielzahl von Membranen des Organismus
Leukozidin (Panton-Valentine-Leukozidin)	<ul style="list-style-type: none"> - Zerstörung polymorphkerniger Granulozyten und Makrophagen - → Hemmung Phagozytose
Exfoliatintoxine A, B	<ul style="list-style-type: none"> - Verursacher des Staphylococcal-Scaled-Skin-Syndrom - → Epidermolyse durch Spaltung intrazellulärer Adhäsionsmoleküle der Dermis
Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1	<ul style="list-style-type: none"> - Superantigen - → polyklonale CD4-T-Zell-Aktivierung mit unkontrollierter Freisetzung von Interleukin-2 aus T-Zellen und Tumornekrosefaktor-α aus Makrophagen
Staphylokokken-Enterotoxine	<ul style="list-style-type: none"> - wirken als Superantigene - Verursacher von z.B. Lebensmittelintoxikationen (Erbrechen, Übelkeit, Fieber)
Hyaluronidase	<ul style="list-style-type: none"> - spaltet intrazelluläre Hyaluronsäure - → Gewebeporosität → Gewebsinvasion
DNase	<ul style="list-style-type: none"> - thermostabile Nuklease - → Spaltung DNA und RNA, Zerstörung der Erbinformation

(DINGES et al., 2000; FOSTER, 2002; GROß, 2013; GATERMANN, 2016)

2.1.2 Resistenzen von *Staphylococcus aureus*

2.1.2.1 Allgemeine Problematik der Antibiotikaresistenz

Die Entwicklung von Resistenzen demonstriert die Fähigkeit bakterieller Krankheitserreger, gegen auf sie einwirkende Selektionsdrücke zu reagieren, die infolge eines therapeutischen Einsatzes von antimikrobiellen Wirkstoffen entstehen können. Bereits wenige Jahre nach der Markteinführung des Antibiotikums Penicillin (1944) wurden erste Penicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme nachgewiesen. Diese waren in der Lage den β -Lactamring des Antibiotikums mittels β -Lactamasen zu hydrolisieren und somit eine Inaktivierung von Penicillin herbeizuführen (LYON & SKURRAY, 1987). Gleichermaßen erging es dem 1960 eingeführten semisynthetischen Derivat Methicillin, denn bereits ein Jahr später wurde der Nachweis Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) in Großbritannien erbracht (JEVONS, 1961). In einer Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts (RKI) wird der Trend der Resistenzentwicklung bei verschiedenen Klassen von Antibiotika zusätzlich zur Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika bei hospital-assoziierten MRSA für die Jahre 2012 – 2014 dargestellt. Die Erhebungen des Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Staphylokokken und Enterokokken beziehen sich dabei auf Staphylokokken-Einsendungen, die in deutschen diagnostischen Einrichtungen isoliert wurden. Die höchsten Resistenzwerte erzielten im Jahr 2014 neben Fluorchinolonen (Ciprofloxacin, Moxifloxacin) mit 80 %, Makrolid- (Erythromycin) und Lincosamid-Antibiotika (Clindamycin) mit jeweils 58,2 % bzw. 50,3 % (RKI, 2015).

2.1.2.2 Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika

Die bakterizide Wirkung der β -Lactam-Antibiotika führt durch Hemmung des Enzyms Transpeptidase zur Blockade des Endstadiums der Peptidoglykansynthese (RICHTER & SCHERKL, 2016). Peptidoglykan, auch Murein genannt, ist als essentielles Strukturelement nicht nur für die Form, sondern auch für die mechanische Stabilität und Integrität der Bakterienzelle verantwortlich (LAMBERT et al., 2002). Lineare Glykanketten, die durch kurze Peptidbrücken miteinander quervernetzt sind, bilden dabei den Mureinsacculus aus (VOLLMER et al., 2008). Penicillin-bindende Proteine (PBPs) sind Transpeptidasen, welche die Katalyse dieser Quervernetzung bewerkstelligen (LAMBERT et al., 2002; SAUVAGE et al., 2008). Da β -Lactame eine hohe Bindungsaffinität gegenüber PBPs besitzen, stören sie auf diesem Weg die bakterielle Zellwandsynthese (LIM & STRYNADKA, 2002).

Die Resistenz von *S. aureus* Stämmen gegen β -Lactam-Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme beruht auf zwei wesentlichen Mechanismen. Zum einen in der Bildung des inhibierenden Enzyms β -Lactamase, für welches das Gen *blaZ* kodiert und zum anderen in der Expression des modifizierten Penicillin-bindenden Proteins 2a (PBP2a),

dessen Transpeptidase-Aktivität nicht durch die Wirkung der β -Lactam-Antibiotika inhibiert werden kann (FUDA et al., 2005). Bedingt durch einen wachsenden Selektionsdruck entstand seit der therapeutischen Anwendung und Weiterentwicklung der β -Lactame eine mikrobielle Synthese von β -Lactamasen (THEURETZBACHER, 2006). Dies ist der häufigste Resistenzmechanismus von *Staphylococcus aureus*. So führt das Genprodukt von *blaZ*, die *Staphylococcus aureus* PC1 β -Lactamase zur hydrolytischen Spaltung des viergliedrigen β -Lactamrings und infolgedessen zur Inaktivierung der antimikrobiellen Wirkung von β -Lactamen (FUDA et al., 2005). Die Transkription des Gens wird über das BlaR-BlaI-BlaZ-Regulationssystem gesteuert. Das *bla* Gen ist dabei mit seinen angrenzenden Regulatorproteinen *blaRI* und *blaI* auf einem gemeinsamen Plasmid lokalisiert (FUDA et al., 2005; HEISIG, 2006). Durch Bindung des Antibiotikums an die Penicillin-bindende Domäne des Signalproteins *blaRI*, kommt es zur Aktivierung einer intrazellulären Metalloprotease, die das Repressorprotein *blaI* proteolytisch spaltet, sodass seine repressive Wirkung inhibiert wird und die Transkription von *blaZ* erfolgen kann (FUDA et al., 2005).

Wesentliches Charakteristikum Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme ist die Integration der mobilen genetischen Einheit staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in die chromosomale DNA der Bakterien. Diese Genkassette enthält das für die phänotypische Ausprägung der Methicillinresistenz verantwortliche Gen *mecA*, welches für das veränderte Penicillin-bindende Protein 2a (PBP2a) kodiert. Anders als die vier nativen von *Staphylococcus aureus* produzierten Penicillin-bindenden Proteine (PBPs), kann PBP2a infolge seiner geringeren Bindungsaffinität gegenüber β -Lactam-Antibiotika seine zum Zellwandaufbau benötigte Transpeptidase-Aktivität aufrechterhalten (PINHO et al., 2001; HIRAMATSU et al., 2002; LIM & STRYNADKA, 2002). Die Transkription des *mecA* Gens wird über das MecR-MecI-MecA-Regulationssystem gesteuert, welches dem BlaR-BlaI-BlaZ-Regulationssystem in seiner Funktion und seiner Struktur bemerkenswert ähnlich ist (FUDA et al., 2005). Zur Expression von *mecA* fungieren das Gen *mecR1* als Signaltransduktionsprotein und *mec1* als Transkriptionsrepressorprotein (HIRAMATSU et al., 2001).

Durch Hemmung der antimikrobiellen Wirkung der β -Lactame können Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme ihr Überleben in der Wirtszelle sichern. Solche resistenten Keime limitieren den therapeutischen Einsatz von Antibiotika sowohl in der tier- als auch in der humanmedizinischen Praxis und stellen als Folge dessen einen erheblichen Risikofaktor für erkrankte Individuen dar.

2.1.2.3 Resistenzen gegen nicht- β -Lactam-Antibiotika

Resistenz gegen Aminoglykoside

Vertreter der Aminoglykosid-Antibiotika (z.B. Gentamicin, Kanamycin, Neomycin) entfalten ihre bakterizide Wirkung, durch Bindung an die 30S-Untereinheit bakterieller Ribosomen. Dadurch kommt es zu Ablesefehlern der m-RNA, die zur Synthese fehlerhafter Proteine sogenannter „Nonsense“-Proteine führt (RICHTER & SCHERKL, 2016). Der Funktionsverlust der Proteine bedingt den bakteriellen Zelltod. Es werden insgesamt drei mögliche Resistenzmechanismen unterschieden, wozu eine mutationsbedingte Strukturveränderung an den Ribosomen bzw., der Zellmembran sowie die Inaktivierung über Aminoglykosid modifizierende Enzyme zählen.

Resistenz gegen Tetrazykline

Tetrazykline sind von Streptomyceten gewonnene Breitbandantibiotika, deren bakteriostatische Wirkung auf der Hemmung der Proteinbiosynthese beruht. Durch aktiven Transport gelangt das Antibiotikum in die Bakterienzelle, wo es an die 30S-Untereinheit des Ribosoms bindet und die Anlagerung der Aminoacyl-t-RNA an die Akzeptorregion verhindert (RICHTER & SCHERKL, 2016). Dies führt zur Synthesehemmung der wachsenden Polypeptidkette. Insgesamt werden zwei Mechanismen der Tetrazyklin-Resistenz für *S. aureus* beschrieben. Zum einen handelt es sich um einen aktiven Effluxmechanismus, der durch die plasmidkodierte Gene *tetK* sowie *tetL* vermittelt wird und zur Senkung der intrazellulären Antibiotikakonzentration führt (CHOPRA & ROBERTS, 2001). Zum anderen kodieren die chromosomal oder auf einem Transposon lokalisierten Determinanten *tetM* und *tetO* für sogenannte Schutzproteine (TRZCINSKI et al., 2000), die das Ribosom vor der Wirkung der Tetrazykline schützt.

Resistenz gegen Makrolide und Lincosamide

Analog den Makrolid-Antibiotika (z.B. Tilmicosin, Tylosin, Erythromycin) ist auch der zentrale Angriffspunkt der Lincosamide (z.B. Lincomycin, Clindamycin) die ribosomale 50S-Untereinheit der Bakterienzelle (RICHTER & SCHERKL, 2016). Die bakteriostatisch wirkenden Substanzen binden im Bereich des Peptidyl-Transferase-Zentrums und verhindern auf diesem Weg die Translation der Messenger-RNA zur Synthese neuer Proteine (DOUTHWAITE & CHAMPNEY, 2001). Infolge der Methylierung der ribosomalen Bindungsstelle A2058 innerhalb der 50S-Untereinheit des Ribosoms wird eine Konformationsänderung der 23s-rRNA verursacht, wodurch neugebildete Ribosomen unangreifbar für die Antibiotika werden (SEIFERT, 2009). Die Methylase-Gene *erm(A)* und

erm(C) treten bei *S. aureus* am häufigsten auf (SEIFERT, 2009). Eine untergeordnete Rolle spielen Resistenzen, bedingt durch einen aktiven Efflux sowie die Inaktivierung durch Enzyme.

Resistenz gegen Sulfonamide und Trimethoprim

Sulfonamide erzielen ihren bakteriostatischen Effekt indem sie die bakterielle Folsäuresynthese inhibieren. Durch ihre chemische Verwandtschaft zur p-Aminobenzoessäure verursachen sie eine Substratkonkurrenz, die zu einer kompetitiven Verdrängung der Dihydropteroinsäure-Synthetase führt. Der Einsatz von Trimethoprim führt zur Hemmung der Dihydrofolsäure-Reduktase und verhindert somit den finalen Schritt der Folsäuresynthese. Beide Mechanismen führen letztendlich zu einer synergistischen Hemmung der Tetrahydrofolsäure-Synthese (RICHTER & SCHERKL, 2016). Neben einer natürlichen Resistenz, die Bakterien besitzen, die exogene Folsäure aufnehmen und verwerten können, existieren auch Resistenzmechanismen, die durch Überproduktion der p-Aminobenzoessäure und/oder durch Produktion einer nicht-sensitiven Dihydropteroinsäure-Synthetase entstanden sind (RICHTER & SCHERKL, 2016). Während bei Staphylokokken die Resistenz gegenüber Trimethoprim durch das Gen *dfrA* auf Transposon Tn4003 kodiert wird, erfolgt die Vermittlung der Sulfonamid-Resistenz durch Mutation des *dhps(foIP)*-Gens (GEISEL & SCHMITZ, 2003).

Resistenz gegen Fluorchinolone (Gyrasehemmer)

Die bakterizide Wirkung von Fluorchinolonen (Enrofloxacin, Marbofloxacin) beruht auf der Hemmung der bakteriellen Topoisomerase II (Gyrase) und IV. Dabei verändert das Enzym Gyrase die räumliche Struktur der DNA-Doppelhelix durch Einführung negativer superhelikaler Windungen („supercoiling“) und bedingt auf diese Weise den Wirkmechanismus (RICHTER & SCHERKL, 2016). Bei der Entstehung einer Fluorchinolonresistenz kommen im Wesentlichen zwei Mechanismen zum Tragen. So kann diese durch spontane Mutationen der bakteriellen Topoisomerase II und IV zu Stande kommen, wodurch eine Bindung des antimikrobiellen Wirkstoffes an entsprechende Zielenzyme verhindert wird. Des Weiteren existiert ein zweiter Resistenzmechanismus, der auf dem Vorhandensein von Efflux-Pumpen basiert, die die Akkumulation des Antibiotikums in der Bakterienzelle deutlich reduzieren. Für *S. aureus* sind diese auf dem *norA*-Gen lokalisiert (NG et al., 1994).

Resistenz gegen Glykopeptide

Mittel der Wahl bei der Behandlung von Infektionen mit MRSA sowie multiresistenten Enterokokken-Stämmen sind die Reserveantibiotika Vancomycin und Teicoplanin, die bei grampositiven Mikroorganismen die bakterielle Zellwandsynthese behindern. Durch Bindung der Glykopeptide an terminale D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen der Pentapeptidseitenketten, wird die Mureinsynthese durch Behinderung der enzymatischen Quervernetzung gestört (REYNOLDS, 1989). Im Jahr 1997 wurde das erste humane *Staphylococcus aureus*-Isolat mit einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin (HIRAMATSU et al., 1997) beschrieben. Über den ersten, vollständig Vancomycin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stamm (VRSA), wurde erstmal im Jahr 2002 berichtet (CHANG et al., 2003; HOWDEN et al., 2010).

Resistenz gegen Fenicole

Fenicole (z.B. Chloramphenicol, Florfenicol) führen zur Inhibierung der Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50S-Untereinheiten bakterieller Ribosomen. Durch die Interaktion mit den Rezeptoren der Peptidyltransferase wird die Katalyse von Peptidbindungen zwischen Aminosäuren sowie der daraus resultierende Aufbau von Peptidketten behindert (RICHTER & SCHERKL, 2016). Insgesamt werden drei verschiedene Resistenzgene im Falle einer kombinierten Chloramphenicol- und Florfenicol-Resistenz beschrieben, *florA* und *fexA*, welche für ein membranassoziiertes Effluxsystem kodieren sowie das Gen *cfr*, das erstmals im Jahre 2000 im Zuge einer Überwachungsstudie bei Staphylokokken detektiert wurde (KEHRENBURG et al., 2005; LONG et al., 2006). Das *cfr*-Gen verursacht nicht nur eine Resistenz bei Fenicolen, sondern auch Kreuzresistenzen bei vier weiteren Antibiotikaklassen (Lincosamide, Oxazolidinone, Pleuromutiline, Streptogramin A). Diese binden alle an das Peptidyltransferase-Zentrum, das in nächster Nähe zum Nukleotid A2503 der 23S-rRNA liegt. Das Plasmid-vermittelte *cfr*-Gen kodiert dabei für eine Methyltransferase, die zur Modifizierung der Position A2503 führt (LONG et al., 2006). Die Veränderung an der Bindungsstelle verhindert folglich die Wirkungsweise aller fünf Antibiotikaklassen.

2.2 Nachweismethoden von MRSA

2.2.1 Kultureller Nachweis

Neben der gebräuchlichen Kultivierung auf konventionellen, nicht-selektiven Nährböden dienen im Handel befindliche chromogene Selektivmedien dem direkten qualitativen Nachweis von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (GAILLOT et al., 2000; PERRY et al., 2003). Die Detektion beruht hier auf der Integration von farblosen Chromogenen, die metabolische Substrate nachahmen und durch spezifische bakterielle Zielenzyme (z.B. durch alkalische Phosphatase) gespalten werden. Im Anschluss an die Spaltung reichert sich das nun unlösliche, farbige Chromogen in der Bakterienzelle an, wodurch wachsende Kolonien angefärbt und eine direkte Identifizierung von MRSA vom Selektivmedium aus ermöglicht wird (MALHOTRA-KUMAR et al., 2008; MALHOTRA-KUMAR et al., 2010).

Das Wachstum der Begleitflora wird unterdessen durch erhöhte Kochsalzkonzentrationen und den Zusatz von Antibiotika wie beispielsweise Methicillin, Oxacillin oder Cefoxitin gehemmt (PERRY et al., 2004; DIEDEREN et al., 2005; FLAYHART et al., 2005; VAN VAERENBERGH et al., 2010). Das Probenmaterial kann entweder direkt auf dem chromogenen Medium ausplattiert oder zuerst in einer selektiven Nährbouillon (z.B. Trypton-Soja-Bouillon) vorangereichert werden. Liegt ein Wachstum MRSA-typischer Kolonien vor, müssen diese nach Subkultivierung, durch weitere biochemische und molekularbiologische Identifizierungsverfahren bestätigt werden (NEUMEISTER et al., 2009).

2.2.2 Molekularbiologische Untersuchungsverfahren zur epidemiologischen Differenzierung von MRSA

2.2.2.1 Nachweis des *mecA*-Gens

MRSA-verdächtige Isolate können mittels Amplifikationsverfahren wie konventioneller oder real-time Polymerasekettenreaktion (PCR) einer molekularbiologischen Bestätigungsreaktion unterzogen werden. So erbringen beispielsweise HULETSKY et al. (2004) den Nachweis für das Vorhandensein des Methicillin-Resistenzgens *mecA* sowie des *Staphylococcus aureus* spezifischen *orfX*-Gens in einer Real-Time PCR. Die Autorengruppe um PASANEN verknüpft ebenfalls die Detektion des Zielgens *mecA* mit der Erfassung des für *S. aureus*-spezifischen Markergens *nuc* in einer Duplex-Real-Time PCR (PASANEN et al., 2010). Demzufolge bestätigt ein positives PCR-Ergebnis nicht nur die Methicillinresistenz sondern auch die Spezies *Staphylococcus aureus*. Dies ist entscheidend, da das *mecA*-Gen ebenfalls für die Methicillinresistenz bei anderen Staphylokokkenspezies wie zum Beispiel den koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) kodiert (BECKER et al., 2006). Die Speziesabsicherung von

S. aureus durch speziesspezifische Gene ist daher eine wichtige Grundvoraussetzung für die Bestätigung MRSA-verdächtiger Isolate und der Vermeidung von falsch positiven Resultaten (HULETSKY et al., 2004; BECKER et al., 2006).

2.2.2.2 SCCmec-Sequenzierung

Eine weitere bedeutende Rolle im molekularbiologischen Nachweis und der Typisierung von MRSA besitzt die Sequenzierung der SCCmec-Genkassette (staphylococcal cassette chromosome *mec*). Diese trägt neben dem *mec*-Genkomplex, der das für die Methicillinresistenz verantwortliche *mecA*-Gen enthält, auch den *ccr*-Genkomplex, der aus den sogenannten site-specific cassette chromosome recombinase-Genen (*ccrAB* und/oder *C*) besteht und für die Mobilität der Genkassette verantwortlich ist (KONDO et al., 2007). Basierend auf der variablen Zusammensetzung dieser Genkomplexe, werden SCCmec-Elemente in verschiedene Typen und Subtypen unterteilt, wodurch eine epidemiologische Differenzierung von MRSA-Isolaten ermöglicht wird (ZHANG et al., 2005).

Nach aktueller Studienlage wurden bis heute insgesamt elf verschiedene SCCmec Typen identifiziert (ITO et al., 2014). Besonders hervorzuheben ist hier der Kassettentyp XI, der ein Homolog des *mecA* Gens, das sogenannte *mecA*_{LGA251} bzw. *mecC* enthält. Dieses wurde erstmals 2011 von einem Rind isoliert (GARCIA-ALVAREZ et al., 2011). Allerdings weist diese Variante zum *mecA*- Gen nur eine Aminosäurehomologie von 63% auf, was erklärt, warum es durch etablierte MRSA-Typisierungsmethoden (z.B. konventioneller PCR für das *mecA*-Gen, PBP2a-Agglutinationstests) nicht detektiert werden kann (GARCIA-ALVAREZ et al., 2011). Solche *mecC* positiven *S. aureus* Isolate konnten auch in anderen europäischen Ländern (CUNY et al., 2011; KRIEGESKORTE et al., 2012; BECKER et al., 2013) nachgewiesen werden und gehören laut RKI „bis auf wenige Ausnahmen zu den klonalen Linien CC130 und ST425“ (RKI, 2013).

2.2.2.3 spa-Typisierung

Die Single Locus Sequenztypisierung des *spa*-Gens, die erstmals 1996 beschrieben wurde, dient der Detektion epidemiologischer Zusammenhänge zwischen einzelnen MRSA-Stämmen (FRENAY et al., 1996). Das Gen selbst kodiert für das zellwandständige Protein A, welches an seinem 3'-Ende eine sogenannte *polymorphe Region X* besitzt. Der Polymorphismus dieser Region, bedingt durch Punktmutation sowie Deletion und Duplikation, spiegelt sich in einer variablen Anzahl von Repeats (3 – 15), bestehend aus durchschnittlich 24 Basenpaaren wieder (SHOPSIN et al., 1999; KAHL et al., 2005). Die Analyse des *spa*-Typs erfolgt mittels einer speziellen Software der Firma Ridom (HARMSEN et al., 2003), in der entsprechende Repeat-Sequenzen ausgelesen und anhand eines alphanumerischen Codes

der *spa*-Typ bestimmt werden kann (<http://www.spaserver.ridom.de>). Als zusätzliches Analysetool enthält die Ridom Staph Type Software den sogenannten Based Upon Repeat Pattern (BURP)-Cluster-Algorithmus. Dieser erkennt verwandtschaftliche Beziehungen zwischen untersuchten Isolaten anhand übereinstimmender Repeatmuster und bildet auf diese Weise Cluster miteinander verwandter *spa*-Typen sogenannte *spa*-CC (HARMSSEN et al., 2003; MELLMANN et al., 2008; STROMMENGER et al., 2008).

Auf Grund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, der schnellen und einfachen Durchführbarkeit sowie der guten Interpretierbarkeit ist die *spa*-Typisierung in der Routinediagnostik besonders weit verbreitet (SHOPSIN et al., 1999; MELLMANN et al., 2005). Dennoch zeigt die Methode auch Grenzen in der Anwendung. So ist der Rückschluss von einem ermittelten *spa*-Typ auf die Zugehörigkeit zu einer klonalen Linien bzw. klonalen Komplex nach Ausführungen des RKI „über begrenzte Zeiträume und geografische Regionen gut möglich, darüber hinaus sind tiefer gehende Analysen erforderlich, da bei MRSA bestimmte klonale Linien offenbar unabhängig voneinander durch weit verbreitete und empfindliche Vorläufer entstehen können (z. B. MRSA ST5).“ (RKI, 2009).

2.2.2.4 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Das Multi Locus Sequence Typing wurde erstmals 1998 für *Neisseria meningitidis*-Stämme beschrieben, ein Jahr später entwickelten ENRIGHT et al. das Verfahren für Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (ENRIGHT et al., 2000). Die Typisierung der MRSA-Isolate erfolgt durch die Sequenzierung von sieben internen Fragmenten sogenannter Haushaltsgene (housekeeping genes), die essenziell und selektionsneutral für den Organismus sind. Demzufolge müssen für jedes zu untersuchende MRSA-Isolat sieben einzelne PCR-Reaktionen, jeweils für die Haushaltsgene *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *tpi* sowie *ycjI* (siehe Tabelle 2), durchgeführt werden. Nach computergestützter Analyse der einzelnen Gensequenzen erhält jedes Isolat Allelnummern, durch deren Aneinanderreihung sich eine siebenstellige Zahlenabfolge ergibt. Diese kann mittels der online verfügbaren Datenbank (www.mlst.net) einem eindeutigen Sequenztypen (ST) zugeordnet und problemlos mit anderen weltweit generierten Isolaten verglichen werden (AANENSEN & SPRATT, 2005). Auf diese Weise definiert das generierte Allelprofil den jeweiligen Sequenztypen (ENRIGHT et al., 2002). Zusätzlich können durch Anwendung des BURST-Algorithmus (Based Upon Related Sequence Types) klonale Verwandtschaften zwischen Allelprofilen detektiert werden, was wiederum eine Zuordnung von Sequenztypen zu klonalen Komplexen (CC) ermöglicht. Ein klonaler Komplex wird dadurch definiert, dass klonal verwandte Sequenztypen identische Allele an mindestens fünf der sieben Genloci mit mindestens einem anderen Mitglied des CC aufweisen (pubmlst.org/analysis/burst/burst.shtml).

Das MLST-Verfahren ist besonders für phylogenetische Verwandtschaftsanalysen geeignet, findet aber durch den erhöhten Arbeitsaufwand und durch steigende Kosten in Laboren nicht routinemäßig Anwendung. MLST und *spa*-Typisierung liefern, ebenso wie die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) eine weitgehende Übereinstimmung in ihren sequenzbasierten Typisierungsergebnissen (STROMMENDER et al., 2006; MELLMANN et al., 2008; STROMMENDER et al., 2008).

2.2.2.5 PCR zur Bestätigung der Zugehörigkeit zum klonalen Komplex CC398

Die Mehrzahl der bei Nutztieren vorkommenden MRSA-Stämme gehört einer bestimmten phylogenetischen Linie, dem sogenannten CC398 an. Während eine Gruppierung in klonale Verwandtschaftskomplexe gegenwärtig durch *spa*-Typisierung (BURP-Algorithmus) bzw. MLST-Typisierung (BURST-Algorithmus) erfolgen kann, bietet die durch STEGGER et al. (2011) beschriebene PCR-Reaktion einen schnelleren Nachweis zur Zugehörigkeit von MRSA-Isolaten zum CC398. Zusätzlich bietet das Verfahren eine hohe Genauigkeit (Sensivität 100%, Spezifität 100%) und überzeugt durch eine geringe Kostenintensität (STEGGER et al., 2011).

2.2.2.6 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Methode der Pulsfeldgelelektrophorese wurde erstmals 1984 von SCHWARZ und CANTOR beschrieben und galt lange Zeit als sogenannter „Goldstandard“ in der Feintypisierung von verschiedenen Bakterienarten (SCHWARTZ & CANTOR, 1984).

Im Vorfeld wird das bakterielle Genom mittels eines selten schneidenden Restriktionsenzym, das nur wenige Erkennungssequenzen besitzt, in eine limitierende Anzahl hochmolekularer DNA-Fragmente (ca. 20) separiert. Um diese während der Präparation vor einwirkenden Scherkräften zu schützen, erfolgt zuvor eine Einbettung der Zellen in Agarose, gefolgt von einem enzymatischem Verdau der Zellbestandteile.

Bei der PFGE handelt es sich um eine Gelelektrophorese im gepulsten Feldstärkegradienten, die besonders für hochmolekulare DNA-Fragmente (> 30kb) eine verbesserte Auflösungsfähigkeit bietet, da sich diese in der konventionellen Gelelektrophorese auf Grund ihrer limitierenden Mobilität nicht mehr effizient auftrennen lassen. DNA-Moleküle, die nun durch die Poren des Agarosegels wandern, müssen sich auf Grund des alternierenden Richtungswechsels des elektrischen Feldes immer wieder neu ausrichten, wofür größere Moleküle mehr Zeit beanspruchen als kleinere. Am Ende eines PFGE-Laufes werden für die untersuchten Bakterienstämme charakteristische Restriktionsprofile generiert, die eine genetische Verwandtschaftsanalyse zwischen den Isolaten einer Spezies ermöglichen.

Zur bandenbasierten Interpretation der Restriktionsprofile finden verschiedene Analysetechniken, wie beispielsweise das visuelle Auswertungsschemata nach TENOVER et al. (1995) oder aber verlässlicher und heutzutage ausschließlich akzeptiert, Computerprogramme wie BioNumerics® oder GelCompar® Anwendung. So kann nach Digitalisierung und Normalisierung der generierten PFGE-Muster eine genetische Verwandtschaftsanalyse anhand unterschiedlicher Clustering-Algorithmen durchgeführt werden.

MRSA-Stämme werden routinemäßig mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* verdaut (BENS et al., 2006). Allerdings ist das Enzym nicht in der Lage das Genom von MRSA-Stämmen, die sich dem MLST-Sequenztyp ST398 zuordnen lassen, zu schneiden. Diese sogenannten nicht typisierbaren „non typable“ ST398-Klone besitzen die Fähigkeit, die Konsensussequenz C^mCNGG am zweiten Cytosin durch die Anwesenheit einer C5-Methyltransferase zu modifizieren (BENS et al., 2006; ARGUDIN et al., 2010b). Auf Grund der Methylierung kann die Restriktionsendonuklease *SmaI* nicht mehr wie gewohnt schneiden, so dass die Typisierung mittels PFGE nicht erfolgen kann. ARGUDIN et al. (2009) beschrieben den Einsatz eines Neoschizomers von *SmaI*, das Restriktionsenzym *Cfr9I*, welches in der Lage ist, an einer anderen Position der Erkennungssequenz (C[^]CCGGG (*Cfr9I*) vs. CCC[^]GGG (*SmaI*); siehe <http://rebase.neb.com>) zu schneiden, um folglich auch nicht typisierbare MRSA-Stämme zu verdauen. Obwohl sich die Pulsfeldgelelektrophorese durch ein hohes diskriminatorisches Potential auszeichnet, handelt es sich um eine technisch anspruchsvolle Methode, die hohe Kosten in der Anschaffung der Geräte sowie der Chemikalien verursacht. Des Weiteren sind eine mangelnde Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen Laboren sowie eine mangelnde Reproduzierbarkeit als Nachteile zu benennen (VAN BELKUM et al., 1998; WICHELHAUS et al., 2000; TE WITT et al., 2010).

2.2.2.7 DNA-Microarray-Technologie

Die DNA-Microarray-Technologie ermöglicht als miniaturisiertes molekularbiologisches Testsystem die zeitgleiche Analyse einer Vielzahl von Genen in einem einzigen Experiment. Das Prinzip basiert auf einer Nukleinsäurehybridisierung. Im Detail werden auf einem festen Träger (beispielsweise Glas-Objektträgern, Siliziumchips, Nitrocellulose-Membranen), Oligonukleotide mit definierter Sequenz als Hybridisierungssonden („probe“) auf einer definierten Position des Microarrays immobilisiert. Wird nun das zu untersuchende Isolat, als einzelsträngiges fluoreszenzmarkiertes PCR-Amplifikat („target“) auf der Array-Oberfläche aufgebracht, kann eine Bindung zwischen exakt komplementären DNA-Sequenzen erfolgen. Nicht hybridisierte Nukleinsäuren werden hingegen in einem nächsten Schritt gewaschen.

Durch Messung der Fluoreszenz kann die Position sowie die Intensität eines jeden Hybridisierungspunktes analysiert und infolgedessen ein Transkriptionsprofil der ausgewählten Gene erstellt werden. (SCHOBER, 2002; MELLMANN & HARMSEN, 2009). Nachteile dieser Technologie liegen im unerwünschten Auftreten von Kreuz- bzw. Fehlhybridisierungen. Des Weiteren liefert ein Microarray nur Information über genomische Sequenzen, für die er auch konzipiert wurde. Somit können bisher unbeschriebene Gene eines Genoms nicht nachgewiesen werden (BUMGARNER, 2013).

2.2.2.8 MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

Ein Analyseverfahren, das in der mikrobiologischen Diagnostik zur Gattungs- und Speziesidentifizierung bakterieller Isolate angewendet wird, ist die Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry kurz MALDI-TOF-MS. Sie wurde von KARAS und HILLENKAMP (KARAS & HILLENKAMP, 1988) entwickelt und seit mehreren Jahren erfolgreich in der Proteomanalytik zur Bestimmung von Molekülmassen von Proteinen eingesetzt (SCHUBERT & WIESER, 2010). Die massenspektrometrische Auftrennung bietet durch kurze Analysezeiten, eine einfache Bedienbarkeit und Automatisierbarkeit sowie einer hohen Sensibilität und Präzision wesentliche Vorteile gegenüber klassischen biochemischen und molekularbiologischen Methoden (CLAYDON et al., 1996; KLIEM & SAUER, 2012). Die in Matrix eingebettete Analyseprobe wird im Hochvakuum des Gerätes durch Laserbeschuss explosionsartig verdampft und dabei ionisiert. Die gebildeten Ionen werden dann in einem elektrischen Feld in Richtung des Detektors beschleunigt und entsprechend ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetrennt. Durch Bestimmung der Flugzeit der einzelnen Analyte wird ein charakteristisches Massenspektrum von der Bakterienprobe ermittelt, das die Grundlage der MALDI-TOF-MS-Differenzierung bildet (SCHUBERT & WIESER, 2010). Mittels eines sogenannten „pattern-matching“-Algorithmus werden die individuellen Proteinprofile der zu untersuchenden Bakterienspezies mit einer im System integrierten Referenzdatenbank verglichen (SAUER et al., 2008). Nach automatisierter Datenauswertung wird ein Zahlenwert („score“) ermittelt, der für die Validität des Differenzierungsergebnisses steht (SCHUBERT & WIESER, 2010). Des Weiteren können die generierten MALDI-TOF-MS Spektren einer weiterführenden statistischen Analyse unterzogen werden, so dass beispielsweise durch Verwendung eines Clustering-Verfahrens ein Vergleich von Bakterienisolaten auf Proteinebene erfolgen kann (FELTENS et al., 2010).

2.3 Epidemiologie von MRSA

2.3.1 Vorkommen und Bedeutung von MRSA bei Tieren

2.3.1.1 MRSA bei Schweinen

Im Rahmen einer präoperativen Untersuchungsmaßnahme wurde bei einem sechs Monate alten Säugling, das erste, ursprünglich von Schweinen stammende Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Isolat nachgewiesen (VOSS et al., 2005). Nach diesem ersten Beleg aus dem Jahr 2005 folgten weitere Studien zum Nachweis von MRSA bei Schweinen, sowohl in Europa (HUIJSDENS et al., 2006; DE NEELING et al., 2007; GUARDABASSI et al., 2007; MEEMKEN et al., 2008; VAN DUIJKEREN et al., 2008; POMBA et al., 2009; FRIESE et al., 2012; SCHULZ et al., 2012; VAN DE VIJVER et al., 2014; DIERIKX et al., 2016), als auch in Kanada, den USA, China, Korea sowie Australien (KHANNA et al., 2008; SMITH et al., 2009; WAGENAAR et al., 2009; WEESE et al., 2011; LIM et al., 2012; PEETERS et al., 2015). Nachdem die Ehefrau sowie die Tochter eines niederländischen Schweinehalters in einem Krankenhaus positiv auf MRSA getestet wurden, untersuchten HUIJSDENS et al. (2006) neben weiteren Familienmitgliedern und Mitarbeitern auch zehn ausgewählte Schweine des Betriebes. Alle MRSA-positiven Isolate ließen sich dem MLST-Typ ST398 sowie dem auch bei VOSS et al. (2005) beschriebenen *spa*-Typ t108 zuordnen.

Diese niederländischen Studien motivierten DE NEELING et al. (2007), die MRSA-Prävalenz gesunder Mastschweine an neun niederländischen Schlachthöfen zu untersuchen. Bei insgesamt 209 (39 %) von 540 getesteten Tieren konnte MRSA aus dem Nasenvorhof isoliert werden. Dabei betrug die Intraherden-Prävalenz 81 %. Wieder gehörten alle Isolate dem Sequenztyp ST398 an. Dominierende *spa*-Typen waren in diesem Fall t011, t0108 und t1254 (DE NEELING et al., 2007). MEEMKEN et al. (2008) detektierten bei 678 untersuchten Schweinen aus 347 niedersächsischen und nordrhein-westfälischen Betrieben eine Einzeltierprävalenz von 13 % und eine Bestandsprävalenz von 18 %. Auch die deutschen MRSA-Isolate ließen sich ausnahmslos dem ST398 zuordnen. Zu übereinstimmenden Resultaten führte auch die Studie von VAN DUIJKEREN et al. (2008). Sie konnten 35 von 310 untersuchten Tieren (11 %), die in 7 von 31 untersuchten Schweinebeständen (23 %) eingestallt waren, als Träger von MRSA identifizieren.

Erste klinische Fälle, in denen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* in Verbindung mit infektiösen Geschehnissen beobachtet wurden ebenfalls beschrieben (VAN DUIJKEREN et al., 2007; SCHWARZ et al., 2008; MEEMKEN et al., 2010). Während diese bei klinisch erkrankten Tieren beobachtet wurden, die an Hautinfektionen (VAN DUIJKEREN et al., 2007) oder Infektionen des Harn- und Geschlechtsapparates (SCHWARZ et al., 2008) litten, gelang

MEEMKEN et al. (2010) des Weiteren der Nachweis von MRSA aus verschiedenen pathologischen Läsionen. Die *spa*-Typen t034 und t011, die mit dem ST398 assoziiert sind, wurden dabei am häufigsten detektiert. MEEMKEN et al. (2010) wiesen zusätzlich in ihrer Studie bei drei MRSA-Isolaten den noch nicht bei Schweinen beschriebenen ST97 nach.

FRIESE et al. (2012) führten Querschnittsstudien in zuvor MRSA-positiv getesteten Schweinebeständen (n=27) in Deutschland durch. Die Probenahmen erfolgten jeweils in einem repräsentativen Stall des Betriebes. Im Detail wurden hier Proben von Tieren (Nasen- und Hauttupfer) als auch der Tierumgebung im Stall (Sammelstaub, -kot, -futter, Sockentupfer) sowie der Stallluft entnommen. Im Ergebnis konnte ein MRSA-Nachweis in 23 von insgesamt 27 (85,2 %) untersuchten Beständen in der Stallluft erfolgen. Des Weiteren erfolgte die Detektion des Erregers in allen untersuchten Schweinebeständen in Tiertupferproben. Im Detail lag die Prävalenz für generierte Nasentupferpools (n=324) bei 88,3 % bzw. für generierte Hauttupferpools (n=324) bei 87,7 %. Regelmäßig war ein Erregernachweis auch in Proben der Tierumgebung möglich, wobei die Nachweishäufigkeit im Stallstaub am höchsten war. Mittels *spa*-Typisierung wurden t011 und t034 als vorherrschende *spa*-Typen identifiziert.

SCHULZ et al. (2012) beprobten im Zuge einer Longitudinalstudie insgesamt sechs Schweinebestände innerhalb eines Zeitraumes von 12 Monaten einmal pro Quartal. Neben der Probenahme im Tierstall, die analog zur Querschnittsstudie von FRIESE et al. (2012) erfolgte, wurden zeitgleich Proben in der Umgebung des Stallgebäudes entnommen. Im Detail handelte es sich dabei um Luftproben und wenn zugänglich um Sockentupferproben, die von der windabgewandten Lee-Seite bzw. der windzugewandten Luv-Seite der untersuchten Ställe stammten. In allen ausgewählten Beständen war zu jedem Untersuchungszeitpunkt ein Nachweis von MRSA im Tierstall möglich. Während bei der Untersuchung der von der Lee-Seite stammenden Außenluftproben, MRSA in insgesamt fünf Luftproben aus drei verschiedenen Beständen vorkamen, wurde zu keinem Zeitpunkt der Erreger in Luftproben von der Luv-Seite des Stalls nachgewiesen. In den auf der Lee-Seite genommenen Sockentupferproben wurden deponierte MRSA regelmäßig gefunden (73%). Im Vergleich dazu gelang der Nachweis in Sockentupferproben von der Luv-Seite in signifikant weniger Proben (33%).

Nachdem die niederländische Regierung im Jahr 2010 beschloss, den Einsatz von antimikrobiellen Substanzen in der industriellen Landwirtschaft durch verschiedene Maßnahmen einzuschränken, konnte bereits im Jahr 2014 ein signifikanter Rückgang des Gesamtabsatzes von Antibiotika im Vergleich zum Index Jahr 2009 festgestellt werden. Im Zuge der Studie von DIERIKX et al. (2016) wurden insgesamt 558 Schlachtschweine, die aus sieben niederländischen Schlachthöfen stammten, mittels Nasentupfer beprobt.

Wider Erwarten wurde bei den untersuchten Tieren eine sehr hohe MRSA-Prävalenz (83 % bzw. 99 %) nachgewiesen. Trotz der deutlichen Reduktion des Antibiotikaeinsatzes zeigten die Ergebnisse der Studie demnach noch kein wesentlicher Effekt auf die MRSA-Kolonisierungsrate bei Schlachtschweinen (DIERIKX et al., 2016).

In außereuropäischen Ländern führten Studien zum Vorkommen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* zu folgenden Ergebnissen: Während KHANNA et al. (2007) in ihrer kanadischen Studie von einer Einzeltierprävalenz von 24,9 % bei 285 untersuchten Schweinen berichteten, detektieren SMITH et al. (2009) eine insgesamt doppelt so hohe Einzeltierprävalenz von 49 % (n=299) in amerikanischen Schweinebeständen. Zusätzlich überprüften SMITH et al. (2009) den MRSA-Status von 20 beruflich exponierter Personen und wiesen bei dieser Gruppe eine MRSA-Prävalenz von 45 % nach. Des Weiteren ließen sich in dieser Studie alle MRSA-Isolate dem Sequenztyp ST398 zuordnen. WAAGENAAR et al. (2009) berichteten nach der Untersuchung neun geschlossener Systeme mittels Staubproben erstmals von einem MRSA-Nachweis in chinesischen Schweinebeständen. Insgesamt fünf von neun untersuchten Betrieben wurden dabei positiv auf MRSA getestet. Alle Isolate gehörten dem *spa*-Typ t899 sowie dem erstmals in Schweinebeständen detektierten Sequenztyp ST9 an.

Dass der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* nicht nur auf die klonale Linie ST398 beschränkt bleibt, wiesen auch LIM et al. (2012) in ihrer koreanischen Studie nach. In insgesamt 21 (3,2 %) von 657 Nasentupfern, die von gesunden Schlachtschweinen stammten, war ein positiver MRSA-Nachweis möglich. Auch wenn der ST398 bei der Mehrzahl der Isolate detektiert wurde, konnten die Autoren auch MRSA der klonalen Linie ST541 und ST72 (human-assoziiert) nachweisen. Auch in einer aktuellen belgischen Studie wurden neben MRSA CC398 auch andere Sequenztypen wie ST9, ST80 und ST239 detektiert. Darüber hinaus ließen sich insgesamt 19 verschiedene *spa*-Typen bei den CC398 Isolaten nachweisen (PEETERS et al., 2015).

2.3.1.2 MRSA bei Geflügel

Im Jahr 2003 führte LEE eine Studie zum Vorkommen von MRSA in Korea durch und untersuchte dafür 296 Geflügelproben, darunter Fleisch, Kot, Futter, Synovia und die Trachea der Tiere. Bei insgesamt drei Isolaten konnte MRSA nachgewiesen werden (LEE, 2003). NEMATİ et al. (2008) erbrachte den ersten Nachweis von MRSA aus Nasen- und Kloakentupfer bei gesunden Masthähnchen in Belgien. Entsprechende Isolate ließen sich den *spa*-Typen t011 und t567 zuordnen, die mit dem MLST-Typ ST398 assoziiert sind (NEMATİ et al., 2008). PERSOONS et al. (2009) führten eine weitere belgische Studie durch und untersuchten dazu nicht nur Masthähnchen (n=75) wie bei NEMATİ, sondern zusätzlich auch

Legehennen (n=50). Nur acht Broilerisolate erwiesen sich als MRSA ST398. Den negativen MRSA-Status der Legehennen führten die Autoren auf einen geringen therapeutischen Einsatz von Antibiotika bei diesen Tieren zurück (PERSOONS et al., 2009). RICHTER et al. (2012) untersuchte die MRSA-Prävalenz in 20 süddeutschen Mastputenbeständen. Neben der Probenentnahme in den Beständen (Trachealtupfer, Kloakentupfer, Staubproben), erfolgte ebenfalls eine Untersuchung exponierter Personen. Neben einer Betriebsprävalenz von 90 % und einer Einzeltierprävalenz von 71,5 %, war ein positiver MRSA-Nachweis bei 46,2 % der regelmäßig im Tierstall arbeitenden Personen festzustellen. Während die Mehrzahl der Isolate dem ST398 angehörte, konnte in einem Trachealtupfer-Isolat, MRSA der klonalen Linie ST1791 detektiert werden (RICHTER et al., 2012).

FRIESE et al. (2013) führten Studien in konventionellen Geflügelmastbeständen im Norden, Osten und Südwesten von Deutschland durch. Im Detail wurden neun Betriebe im Zuge einer Querschnittsstudie untersucht und zwar im letzten Drittel der Mastperiode bzw. in sieben Betrieben im Zuge einer Longitudinalstudie über den Zeitraum kurz nach Einstellung bis kurz vor Ausstallung. Die Probenahmen erfolgten im Tierstall (Tierproben, Tierumgebungsproben, Luftproben) sowie für die longitudinale Studie auch in der direkten Umgebung der Bestände (Luftproben, Sockentupferproben). In der Querschnittsstudie konnte das Vorkommen von MRSA in der Stallluft in sieben von insgesamt neun (77,8 %) Betrieben nachgewiesen werden. Des Weiteren war in acht der neun Bestände ein MRSA-Nachweis in Tierproben möglich, wobei die Prävalenz für generierte Choanentupferpools (n=108) bei 63,9 % bzw. für Hauttupferpools (n=108) bei 66,7 % lag. Zwischen der Anzahl an MRSA-positiven Tierproben und der Anzahl positiver Luftproben im Stall bestand eine positive Korrelation. Bis auf eine Ausnahme war im Verlauf der longitudinalen Untersuchungen stets ein Nachweis von MRSA im Staub, in der Luft oder in den Tierproben innerhalb der Ställe möglich. Zusätzlich wurden in Proben der Bodenoberfläche, aber vereinzelt auch in Außenluft-Proben der Abluffahne Erreger nachgewiesen. Mittels *spa*-Typisierung erfolgte für insgesamt 80 Isolate eine weiterführende Charakterisierung, wobei die Mehrzahl der Isolate t011 (31/80, 38.75%) angehörten.

In einer niederländischen Studie von GEENEN et al. (2013) wurden zusätzlich zu den Tierbeständen auch Personen und deren Wohnungen auf ein Vorkommen von MRSA untersucht. Während ein positiver MRSA-Nachweis in elf von 250 (4,4 %) Trachealpoolproben sowie 15 von 755 (2,0 %) Staubproben erbracht werden konnte, wurde MRSA ST398 auch bei acht von 145 (5,5 %) untersuchten Personen detektiert, darunter vier Putenmägern, drei Familienmitgliedern und einem Mitarbeiter sowie in fünf von 233 (2,1 %) untersuchten Proben der betrieblich angeschlossenen Wohnungen (GEENEN et al., 2013). In einer weiteren aktuelleren niederländischen Studie von VAN DUIJKEREN et al. (2016) wurden neben zehn

Puten- und zehn Entenbeständen ebenfalls Tierhalter sowie deren Familienmitglieder und Wohnungen untersucht. Allerdings handelte es sich bei den Isolaten um MRSA CC398-Isolate aus Putenbeständen. Im Detail gelang ein positiver Nachweis bei fünf von elf Landwirten, zwei von 32 Familienmitgliedern sowie bei 15 von 49 Proben aus deren Wohnungen. Die Studie zeigte demnach, dass der tägliche Tierkontakt mit den Puten zu einer höheren MRSA Besiedlung führt als es beispielsweise bei den Familienmitgliedern oder allgemein in der niederländischen Bevölkerung der Fall ist. Durch Ganzgenomsequenzierung wurden darüber hinaus Isolate von Tieren und Menschen als identisch eingestuft, was gemäß den Autoren auf eine Transmission hindeuten lässt (VAN DUIJKEREN et al., 2016).

2.3.1.3 MRSA bei Wiederkäuern

1972 erbrachten DEVRIESE et al. (1972) erstmals den Nachweis von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* bei Wiederkäuern in Belgien, wobei es sich auch um die Erstbeschreibung von MRSA bei Tieren handelte (DEVRIESE et al., 1972). Weitere Publikationen bezüglich der Prävalenz von MRSA bei Wiederkäuern folgten aus Korea (LEE, 2003), Ungarn (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007), Belgien (VANDERHAEGHEN et al., 2010) den Niederlanden (GRAVELAND et al., 2010) sowie Deutschland (SPOHR et al., 2011). Den ersten Nachweis einer direkten Übertragung von MRSA zwischen Mensch und Tier erbrachten JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al. (2007). Sie schlussfolgerten aus ihren Untersuchungsergebnissen, dass eine unmittelbare Transmission von MRSA zwischen den Milchkühen eines ungarischen Betriebes sowie einem positiv getesteten Tierpfleger stattgefunden haben muss. Denn nicht nur das humane MRSA-Isolat, sondern auch die ausgewählten bovinen Isolate ließen sich ausnahmslos dem seltenen *spa*-Typen t127 zuordnen. GRAVELAND et al. (2010) wiesen in ihrer Studie nach, dass ein intensiver Tierkontakt sowie die Anzahl MRSA-positiver Tiere im Betrieb ein Risikofaktor für beruflich exponierte Personen darstellt, selbst MRSA-Träger zu werden. Zusätzlich war eine höhere MRSA-Prävalenz bei Tieren zu verzeichnen, die vorher mit Antibiotika behandelt wurden. Dabei wiesen die Autoren am häufigsten MRSA ST398 (n=259) nach.

SPOHR et al. (2011) untersuchten in ihrer Studie drei Milchviehbestände in Südwestdeutschland, wobei ebenfalls eine Beprobung exponierter Personen erfolgte. Alle MRSA-positiven humanen Isolate (n=11) sowie alle Isolate aus der Milch (n=14) wurden ausnahmslos dem ST398 assoziierten *spa*-Typ t011 zugeordnet. Während in aktuellen Beiträgen aus den Niederlanden (TAVAKOL et al., 2012), Großbritannien (PATERSON et al., 2012) und Deutschland (TENHAGEN et al., 2014) in untersuchten Milchproben fast ausschließlich MRSA ST398 nachgewiesen wurde, konnte in einer koreanischen Studie auch der MLST-Typ ST72 detektiert werden (LIM et al., 2013).

2.3.1.4 MRSA bei Companion Animals

Zahlreiche Studien zum Vorkommen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* bei Pferden, Hunden, Katzen und anderen Heimtieren wurden in den letzten Jahren veröffentlicht. Nicht zuletzt, um der Frage eines erhöhten Übertragungsrisikos von MRSA durch den engen Kontakt zwischen Tierhalter und Begleittier nachzugehen. Dass feline und canine MRSA-Isolate eine nahe genetische Verwandtschaft zu einem in Irland regional dominierenden humanen MRSA-Stamm aufzeigen, beweisen O'MAHONY mittels Pulsfeldgelelektrophorese (O'MAHONY et al., 2005). WALTHER et al. (2008) berichten in ihrer Studie über das Vorkommen von MRSA bei Hunden und Katzen sowie anderen kleinen Heimtieren und Exoten wie einem Papagei, einer Schildkröte und einer Fledermaus. Dafür untersuchten sie 869 klinische Proben, die in der Kleintierklinik der Freien Universität Berlin isoliert wurden. Insgesamt wurden 61 Isolate als *S. aureus* und wiederum 27 davon als MRSA identifiziert, wobei der Sequenztyp ST22 am häufigsten detektiert wurde (WALTHER et al., 2008). Auch STROMMENDER et al. (2006) wiesen am häufigsten ST22 MRSA nach, ein in deutschen und auch britischen Krankenhäusern weit verbreiteter Stamm. Daraus schlussfolgern sie, dass sehr wahrscheinlich eine Transmission von Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* zwischen Mensch und Tier stattgefunden hat (STROMMENDER et al., 2006). In einer aktuellen Studie aus Österreich wird über ein zehn Wochen altes Zwergkaninchen mit einem positiven MRSA-Nachweis berichtet. Das MRSA-Isolat ließ dem *spa*-Typ t011 zuordnen, der mit dem ST398 assoziiert ist und dessen Vorkommen vor allem bei Nutztieren beschrieben wurde (LONCARIC & KUNZEL, 2013). Während VINCZE et al. (2014) bei caninen und felines MRSA-Isolaten am häufigsten die klonalen Komplexe CC22 und CC5 nachwiesen, dominierte unter den equinen MRSA-Isolaten der CC398 (VINCZE et al., 2014) .

2.3.2 Vorkommen und Bedeutung von MRSA beim Menschen

2.3.2.1 „hospital-assoziierte“ MRSA (ha-MRSA)

Staphylococcus aureus ist ein grampositives Bakterium, das bei etwa 30 % aller Menschen als Besiedler der normalen Haut- und Schleimhautflora vorkommt. Die in Einrichtungen des Gesundheitswesens erworbenen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*, die sogenannte Gruppe der hospital-assoziierten MRSA, ist die in Deutschland am häufigsten nachgewiesene MRSA-Variante (FRIEDRICH, 2009). Die klonalen Linien ST22 und ST225 sind die am häufigsten in Krankenhäusern im gesamten Bundesgebiet nachgewiesenen Typen (RKI, 2013). Neben Krankenhausaufhalten gelten sich wiederholende Antibiotikatherapien, chronische Pflegebedürftigkeit, Dialysepflicht, invasive medizinische Eingriffe wie Transplantationen, chronische Haut- und Weichteilinfektionen, aber auch Venen- und Blasenkatheter als entscheidende Risikofaktoren einer ha-MRSA-Infektion beim Menschen. Ist eine Person mit MRSA kolonisiert, besteht die Gefahr, den Keim auch auf andere Personen zu übertragen, wobei ältere Menschen, hier besonders gefährdet sind. Demzufolge muss ein striktes Hygienemanagement bei einem Krankenhausaufenthalt eingehalten werden, um einer Weiterverbreitung entgegenzuwirken.

Laut Ausführungen des RKI konnte in den vergangenen Jahren stetig ein Rückgang von ha-MRSA registriert werden. Diese Entwicklung kann anhand von generierten Daten aus unterschiedlichen nationalen und internationalen Surveillance-Systemen nachvollzogen werden (RKI, 2013). So zeigen die aktuellen Kontrollberichte des European Antimicrobial Resistance Surveillance Networks (EARS-Net) eine Abnahme der Methicillin-Resistenz-Rate aus Blutkulturen innerhalb eines Jahres von 15,4 % (2012) auf 12,7 % (2013). Ein ähnlicher Trend wird durch die Untersuchungen der Antibiotika-Resistenz-Surveillance (ARS) in Deutschland verdeutlicht. Hier sanken die ermittelten MRSA-Prävalenzen aus Blutkulturen 17,0 % in 2012 auf 13,9 % in 2013 (RKI, 2015). Im Vergleich zu Deutschland konnte in den Niederlanden durch das konsequente Vorgehen nach dem „Search & Destroy“-Prinzip die Prävalenzrate unter fünf Prozent gehalten werden. Vergleichbare Erfolge waren auch in anderen Nachbarländern wie Dänemark oder Finnland zu beobachten (FRIEDRICH, 2009).

2.3.2.2 „community-assoziierte“ MRSA (ca-MRSA)

Infektionen, verursacht durch den sogenannten community-assoziierten MRSA, der als weltweiter „emerging pathogen“ und weitere MRSA-Variante dargestellt wird, treten besonders bei gesunden Kleinkindern, Kindern und Jugendlichen in Erscheinung (LINDE & LEHN, 2006). Diese jungen Menschen sind in der Regel immunkompetent und besitzen keine wie bei ha-MRSA assoziierten Risikofaktoren oder chronische Grunderkrankungen (RKI, 2013). Der

intensive Kontakt innerhalb der Gemeinschaft wie beispielsweise zwischen Familienmitgliedern oder Sexualpartnern erleichtert die Übertragbarkeit des ca-MRSA. Nach LINDE und LEHN (2006) leiden die Patienten klassischerweise an multiplen Abszessen, die bis zur Gewebsnekrose führen können. Weitere schwerwiegende Komplikationen sind Osteomyelitis, Endokarditis, septische Arthritis oder nekrotisierende hämorrhagische Pneumonien und wurden ebenfalls beschrieben (NAIMI et al., 2001; LINDE & LEHN, 2006; FRIEDRICH, 2009). Molekularbiologisch lassen sich community-assoziierte MRSA von hospital-assoziierten MRSA im Wesentlichen in ihrem SCCmec-Element unterscheiden. Während bei ha-MRSA die SCCmec Typen I, II und III dominieren, ist bei ca-MRSA der vorherrschende SCCmec Typ IV zu finden (FRIEDRICH, 2009). Laut LINA et al. (1999) produzieren nur weniger als fünf Prozent der *Staphylococcus aureus*-Stämme den Virulenzfaktor Panton-Valentine-Leukozidin (PVL). Dieser ist charakteristisch für die meisten community-assoziierten MRSA und führt nicht nur zur Lyse von Leukozyten, sondern auch zur Nekrose von Geweben (LINA et al., 1999). Während in Deutschland ein Anstieg PVL-positiver MRSA-Isolate von 1,8 % im Jahr 2005 auf 3,1 % im Jahr 2006 zu verzeichnen war (WITTE et al., 2007a), belief sich dieser in den Niederlanden im Jahr 2000 noch auf fünf Prozent, verdreifachte sich aber 2002 schon auf 15 % (WANNET et al., 2005).

2.3.2.3 „livestock-assoziierte“ MRSA (la-MRSA)

Auch wenn sich der Begriff des sogenannten „livestock-assoziierten“ MRSA (la-MRSA) in den letzten Jahren weltweit in der Wissenschaft etabliert hat, muss dieser nach aktuellem Forschungsstand kontrovers diskutiert werden. So wiesen beispielsweise Studien von MEEMKEN et al. (2010), LIM et al. (2012, 2013), RICHTER et al., (2012), oder GRAVELAND et al., (2010) nach, dass nicht alle MRSA-Stämme, die bei Nutztieren isoliert werden, ausnahmslos dem Sequenztyp ST398, welcher im Allgemeinen als „livestock-assoziiert“ definiert wurde, zugeordnet werden können. Landwirtschaftliche Nutztiere wie Schweine, Wirtschaftsgeflügel oder Rinder wurden in den vergangenen Jahren weltweit auf das Vorkommen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* untersucht. Dabei stellt sich die Frage, inwiefern die kommerzielle Nutztierhaltung ein Reservoir für das humane Gesundheitswesen darstellt. Zahlreiche Autoren wie beispielsweise VOSS et al., (2005); HUIJSDENS et al., (2006); JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al. (2007); SMITH et al., (2009); GRAVELAND et al. (2010); SPOHR et al. (2011); RICHTER et al., (2012) und GEENEN et al. (2013) konnten nicht nur in untersuchten Tierbeständen sondern auch bei beruflich exponierte Personen und derer Familien MRSA nachweisen. Aus diesem Grund wird für diese Gruppe von MRSA-Isolaten sehr häufig der Begriff „livestock-assoziierte“ MRSA verwendet (KÖCK et al., 2011). Die molekulare Typisierung die im Zuge der oben genannten Studien erfolgte,

ergab, dass die Mehrheit der bovinen, porcinen, aviären und humanen Isolate dem Sequenztyp ST398 sowie den *spa*-Typen t108, t011 und t034 zugeordnet wurde. Die Möglichkeit einer Transmission von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* zwischen Mensch und Tier wird somit sehr wahrscheinlich. Risikofaktoren beruflich exponierter Personen sind der direkte Tierkontakt, die Arbeit in Beständen mit einer hohen MRSA-Prävalenz sowie die Inhalation kontaminierten Staubes (CUNY et al., 2009; GRAVELAND et al., 2010). CUNY et al. (2009) wiesen in Deutschland bei 86 % der Schweinehalter sowie 45 % der Veterinäre eine nasale Kolonisation von MRSA nach. Bei den Familienmitgliedern der Landwirte lag die MRSA-Prävalenz bei 4,3 % und bei den Familienmitgliedern der Veterinäre bei 9 %. Sie schlussfolgerten, dass für exponierte Personen mit genannten Risikofaktoren ein 138-fach höheres Risiko einer MRSA-Besiedlung besteht als für nicht Exponierte im unmittelbaren Wohnumfeld. In einer niederländischen Studie wurden neben Tierärzten auch Veterinärmedizinern untersucht. Die Autoren kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass diese bei der Tätigkeit in Nutztierbeständen ein höheres Risiko einer MRSA-Kolonisierung tragen (WULF et al., 2006).

2.4 Bedeutung und Vorkommen von MRSA in Umgebungsproben

Neben der Detektion von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Isolaten bei landwirtschaftlichen Nutztieren folgten in den letzten Jahren Studien zur Untersuchung der direkten Haltungsumwelt der Tiere (SPRINGER et al., 2009; NATHAUS et al., 2010; FRIESE et al., 2012; SCHULZ et al., 2012; FRIESE et al., 2013). Nach dem positiven Nachweis von MRSA in Tierställen stellte sich die Frage nach einer möglichen Emission der Keime aus dem Stallgebäude in deren Umgebung. So fanden zusätzliche Untersuchungen zur Detektion luftgetragener MRSA in der Stallluft und Abluft von Tierhaltungen statt. CHAPIN konnten mittels Impingement 137 Isolate, wovon 32 % (n=44) als Staphylokokken identifiziert wurden, aus der Stallluft eines Schweinebetriebes isolieren (CHAPIN et al., 2005). Auch GIBBS et al. (2006) sowie GREEN et al. (2006) führten Luftprobenahmen zum Nachweis von antibiotika-resistenten Bakterien im Stallinnern, aber auch auf der windabgewandten Seite (25 m) und der windzugewandten Seite (25 m, 50 m, 100 m, 150 m) eines amerikanischen Schweinebetriebes durch. Insgesamt wurden zwei Gruppen von kultivierbaren Bakterien detektiert, wobei *Staphylococcus aureus* mit einem Anteil von 76 % am häufigsten vorkam (GIBBS et al., 2006; GREEN et al., 2006). Die luftgetragene Verbreitung von multiresistenten Keimen stellt nach GIBBS et al. (2006) nicht nur für das Betriebspersonal, sondern auch für Anwohner in der Umgebung eine Gesundheitsgefährdung dar.

Die Untersuchung konventionell geführter Schweine- und Geflügelhaltungen in Deutschland erfolgte im Rahmen von Querschnitts- sowie Longitudinalstudien (SCHULZ et al., 2012, FRIESE et al., 2012, FRIESE et al., 2013). Luftgetragene MRSA konnten im Tierstall via Impingement und Filtration nachgewiesen werden, während die Stallumgebung zur Beurteilung einer Emission von MRSA ähnlich wie bei GIBBS et al. (2006) sowie GREEN et al. (2006) beprobt wurde. Die Longitudinalstudie beinhaltete das zusätzliche Abschreiten stallumgebender Bodenoberflächen in verschiedenen Entfernungen mittels Sockentupfer, um sedimentierte MRSA nachweisen zu können. Insgesamt war bei 85,2 % der in der Querschnittsstudie untersuchten Schweinebestände bzw. 77,8 % der Mastgeflügelbestände ein MRSA-Nachweis in der Stallluft möglich. Die Autoren beschrieben den Stallstaub als wahrscheinlichste Haupteintragsquelle luftgetragener Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*. Im Rahmen der Longitudinalstudie war ein positiver MRSA-Nachweis in einzelnen Außenluftproben der untersuchten Schweine- sowie Putenbestände möglich. Die Detektion war bis zu einer maximalen Entfernung von 150 m auf der windabgewandten Seite der Tierställe gegeben. Ein regelmäßiger Nachweis von MRSA war hingegen in allen Tierhaltungen auf den stallumgebenden Bodenoberflächen bis zur maximalen Entfernung von 500 m auf der Lee-Seite möglich.

3 Material

3.1 Herkunft der Isolate

Zur Erfüllung eines Entscheidungshilfebedarfs des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) wurde der Forschungsverbund „MRSA-Problematik in der Nutztierhaltung“ im Frühjahr 2009 initiiert. Die vorliegende Arbeit beinhaltet die weiterführende Untersuchung ausgewählter Isolate aus Proben, die im Rahmen eines zuvor durchgeführten Teilprojekts des Instituts für Tier- und Umwelthygiene der Freien Universität Berlin und des Instituts für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover in den Jahren 2009 bis 2011 genommen wurden. Ziel des Teilprojektes war die Untersuchung des Vorkommens von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* bei landwirtschaftlichen Nutztieren, in der Haltungsumwelt der Tiere sowie in der Stallluft und der Stallabluft. So wurden Feldstudien in konventionell geführten Schweine- und Geflügelbetrieben durchgeführt, um ein Übertragungsrisiko luftgetragener MRSA-Stämme aus Nutztierställen auf andere Tierbestände oder Anwohner in der Umgebung bzw. einen Eintrag von MRSA in die Umwelt einschätzen zu können. Im Zuge einer Longitudinalstudie wurden dabei vier Schweinemast- und zwei Schweinezuchtbestände je vier Mal während eines Jahres sowie zwei Masthähnchen- und fünf Putenmastbestände drei- bzw. viermalig innerhalb der Mastperiode untersucht.

3.2 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

15-well comb and comb holder	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
50-well disposable plug mold	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Analysewaage	Faust Lab Science GmbH (Klettgau)
casting stand	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
CRYOBANK™-Kryoröhrchen	Mast Diagnostica GmbH (Reinfeld)
Elektrophorese-Kammer	CompactM; Biometra GmbH (Göttingen)
Inkubator	Heraeus B6200 incubator; Thermo Electron LED GmbH (Langenselbold)
Küvetten	1940 Semi-Micro; Kartell Labware (Silverwater, NSW, Australia)
Magnetrührer	IKAMAG® RH; IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)

Material

MALDI-TOF Massenspektrometer	MALDI Biotyper microflex™ LT; Bruker Daltonik GmbH (Bremen)
MALDI-Targetplatte	MSP 96 target polished steel plate (MicroScout Target); Bruker Daltonik GmbH (Bremen)
Mikrozentrifuge	MiniStar; VWR International GmbH (Darmstadt)
Molecular Imager®	Chemi Doc™ XRS Imaging System; Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
PCR Werkbank	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation; PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
pH-Meter	pH 211 Microprocessor pH-Meter; HANNA Instruments Deutschland GmbH (Kehl am Rhein)
Photometer	BioPhotometer plus; Eppendorf AG (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf Reference; Eppendorf AG (Hamburg)
Präzisionswaage	822-61; Kern & Sohn GmbH (Balingen- Frommern)
Pulsfeldgelelektrophorese-Kammer	CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis Systems; Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Reaktionsgefäße (0,2ml, 1,5ml)	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht)
Schüttler	WS-5; Edmund Bühler GmbH (Tübingen)
Spannungsgerät	Power Pac 200; Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Sterilwerkbank	HERAsafe HS 18; Kendro Laboratory Products (Hanau)
Thermocycler	T Professional Standard Gradient Thermocycler; Biometra GmbH (Göttingen)
Thermomixer	Thermomixer pro; CellMedia GmbH & Co. KG (Gutenborn)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424; Eppendorf AG (Hamburg)
Ultraschallprozessor	UP100H; Hielscher Ultrasound Technology (Teltow)
Vortexer	IKA® Vortex 3; IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q® Advantage A10®; Millipore S.A.S. (Molsheim, FR)
Wasserbad	WNB 22; Memmert GmbH + Co.KG (Schwabach)
Zentrifugen	Centrifuge 5430 und 5415R; Eppendorf AG (Hamburg)

3.3 Chemikalien

Von folgenden aufgeführten Firmen wurden die unten genannten Reagenzien bezogen:

10x Buffer Cfr9I	Thermo Fisher Scientific Bioscience (St. Leon-Rot)
------------------	--

Acetonitril	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agarose Standard (Roti®garose)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ameisensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Biozym LE <i>Genetic Pure</i> Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
Borsäure	VWR International GmbH (Darmstadt)
DreamTaq™ Green PCR MasterMix (2x)	Thermo Fisher Scientific Bioscience (St. Leon-Rot)
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain; 10.000x in Water	Biotium (Hayward, CA, USA)
Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Bioscience (St. Leon-Rot)
Glycerol	Merck KGaA (Darmstadt)
Lamda Ladder PFG Marker	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Lysostaphin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Midori Green Advance DNA Stain	Biozym Scientific GmbH, (Oldendorf)
Natriumchlorid	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck KGaA (Darmstadt)
N-Lauriylsarcosine	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Proteinase K	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Reinstwasser	Milli-Q® Integral Water Purification Systems, Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Restriktionsendonuklease Cfr9I	Thermo Fisher Scientific Bioscience (St. Leon-Rot)
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
SeaKem® Gold Agarose	Lonza (Rockland, ME, USA)
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	VWR International GmbH (Darmstadt)
Water, Mol Bio Grade, DNase-, RNase and Protease-free	5 Prime GmbH (Hamburg)
α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (Art.# 255343)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen)

3.4 Fertige Reaktionssysteme (Kits)

Folgende fertige Reaktionssysteme wurden verwendet:

<i>S. aureus</i> ArrayStrip™ (Assay ID: 10248)	Alere Technologies GmbH (Jena)
HybridisationPlus Kit	Alere Technologies GmbH (Jena)
innuPREP PCRpure Kit	Analytik Jena AG (Jena)
nexttec™ Genomic DNA Isolation Kit for Bacteria	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)

3.5 Nährmedien

Diese Nährmedien wurden vom Hersteller bezogen bzw. nach Herstellerangaben zubereitet und eingesetzt:

Columbia Agar mit Schafblut PLUS	PB5039A; Oxoid (Wesel)
Hirn-Herz-Agar	113825; Merck KGaA (Darmstadt)
CHROMagar™ MRSA	201402; MAST Diagnostica GmbH (Reinfeld)

3.6 Lösungen

Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

5xTBE-Puffer

- 54 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- 27,5 g Borsäure
- 20 ml 0,5 M EDTA Stocklösung
- ad 1000 ml Milli-Q® Wasser

0,5xTBE-Puffer

- 100 ml 5xTBE-Puffer
- ad 1000 ml Milli-Q® Wasser

1,2% Agarose

- 1,2 g Agarose Standard auf 100 ml 0,5xTBE
- Zugabe von 4 µl Midori Green

Lösungen für die Pulsfeldgelelektrophorese

0,5 M EDTA-Stocklösung

- 186,12 g EDTA
- ad 1000 ml Milli-Q® Wasser
- pH 8,0 (eingestellt mit NaOH)

5xTBE-Puffer

- 54 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- 27,5g Borsäure
- 20 ml 0,5 M EDTA Stocklösung
- ad 1000 ml Milli-Q® Wasser

1 M Tris-HCl-Stocklösung

- 12,114 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- ad 1000 ml Milli-Q® Wasser
- pH 8,0 (eingestellt mit HCl)

ESP-Puffer (0,5 M EDTA, 1% N-Lauriylsarcosine, 1mg/ml Proteinase K)

- 25 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)
- 0,25 g N-Lauriylsarcosine
- 23 mg Proteinase K

TE-1-Puffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA)

- 50 ml Tris-HCl 1 M (pH 8,0)
- 100 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)
- ad 500 ml Milli-Q® Wasser

TE-2-Puffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA)

- 5 ml Tris-HCl 1 M (pH 8,0)
- 1 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)
- ad 500 ml Milli-Q® Wasser

Enzympuffer für Cfr9I (1x)

- 10x Puffer mit Milli-Q® Wasser 1:10 verdünnen

Agaroseblöckchen

- 0,18 g Biozym LE GP Agarose ad 10 ml Milli-Q® Wasser

Agarose

- 1,2 g SeaKem® Gold Agarose ad 100 ml 0,5xTBE

Gel Red™ Färbelösung

- 300 ml 0,1 M NaCl

- 35 µl Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain

Lösungen für die MALDI-TOF-MS-Analyse

Präparation Matrixlösung

Für die Herstellung der Matrixlösung wurden ca. 25mg α -Cyano-4 hydroxizimtsäure abgewogen und zu 1 ml organischer Lösung („OS“) hinzugefügt, bestehend aus 500 µl Acetonitril, 475 µl Aqua bidest und 25 µl Trifluoressigsäure. Danach wurde die Matrixlösung mittels eines Vortexers gut durchmischt, für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und der Inhalt abschließend nochmals heruntergeschüttelt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

3.7 Primer zur PCR Amplifikation

Alle in Tabelle 2 gelisteten Primer wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) bezogen.

Tabelle 2: Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer

Molekulare Typisierung	Primer	Primersequenz (5' - 3')	Amplikonlänge in bp	Region/Zielgen	Referenz
spa-Typisierung	spa-1113f	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	182-254 bp	Protein A Gen	KAHL et al., 2005
	spa-1514r	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	182-254 bp	Protein A Gen	
PCR zur Bestätigung des CC398	forward universal sau1-hsdS1 AF primer	AGGGTTTGAAGGCGAATGGG	296 bp	sau1-hsdS1 Gen	STEGGER et al., 2011
	CC398r1	CAGTATAAAGAGGTGACATGACCCCT	296 bp	sau1-hsdS1 Gen	
MLST	arcC-Up	TTGATTCACCAGCGGTATTGTC	456 bp	Carbamat-Kinase	ENRIGHT et al., 2000
	arcC-Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456 bp	Carbamat-Kinase	
	aroE-Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456 bp	Shikimate-Dehydrogenase	
	aroE-Dn	GGTGTTGTATTAATAACGATATC	456 bp	Shikimate-Dehydrogenase	
	glpF-Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465 bp	Glycerol-Kinase	
	glpF-Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465 bp	Glycerol-Kinase	
	gmk-Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429 bp	Guanylate-Kinase	
	gmk-Dn	TCATTAAC TACAACGTAATCGTA	429 bp	Guanylate-Kinase	
	pta-Up	GTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474 bp	Phosphat-Acetyltransferase	
	pta-Dn	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	474 bp	Phosphat-Acetyltransferase	
	tpi-Up	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA	402 bp	Triosephosphat-Isomerase	
	tpi-Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402 bp	Triosephosphat-Isomerase	
	yqil-Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516 bp	Acetyl-Coenzyme-A-Acetyltransferase	
	yqil-Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516 bp	Acetyl-Coenzyme-A-Acetyltransferase	

3.8 *Staphylococcus aureus* Referenzstämme

3.8.1 Referenzstandard NCTC 8325

Für die Pulsfeldgelelektrophorese wurde als Molekulargewichtsstandard der Referenzstamm *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 verwendet.

3.8.2 MRSA Kontrollstamm 08S00699

Der aufgeführte Kontrollstamm wurde durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) bereitgestellt und als Positivkontrolle in allen beschriebenen PCR Reaktionen verwendet.

Stamm	08S00699
Spezies	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
SCC<i>mec</i>-Typisierung	<i>mecV</i>
<i>spa</i>-Typ	t2997
MLST	ST398

3.9 Verwendete Computerprogramme

Folgende Computerprogramme wurden verwendet:

ArrayMate™	Alere Technologies GmbH (Jena)
BioNumerics (Version 6.6)	Applied Maths (Kortrijk, Belgium)
MALDI Biotyper (Version 3.0)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen)
Flex Analysis (Version 3.0)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen)
FlexControl (Version 3.0)	Bruker Daltonik GmbH (Leipzig)
PAST (PALaeontological STatistics software package for education and data analysis, Version 1.80)	http://folk.uio.no/ohammer/past/

4 Methoden

4.1 Probenahme in den Beständen – Teilprojekt (Longitudinalstudie)

4.1.1 Probenahmeplan

Schweinebestände

Gemäß dem Projektplan wurden sechs Schweinebestände, darunter vier Mast- und zwei Zuchtbetriebe, im Rahmen der Longitudinalstudie untersucht. Die Beprobung erfolgte innerhalb eines Zeitraumes von zwölf Monaten einmal pro Quartal.

Geflügelbestände

Gemäß dem Projektplan wurden zwei Masthähnchen- sowie fünf Putenmastbeständen im Rahmen der Longitudinalstudie untersucht. Die Beprobung erfolgte drei- bzw. viermal pro Mastdurchgang in den Masthähnchen- bzw. Putenmastbeständen.

4.1.2 Probenahme in den Beständen

Innerhalb des Tierstalls

Nähere Details zur Probenentnahme und -aufbereitung, welche im Vorfeld dieser Arbeit stattfanden, sind bei SCHULZ et al. (2012) sowie FRIESE et al. (2012, 2013) zu finden.

Tierproben

Schwein

Bei 60 zufällig ausgewählten Tieren eines Bestandes wurde der Nasenvorhof sowie die Hautpartie hinter dem Ohr mit Hilfe eines Baumwolltupfers beprobt.

Geflügel

Bei 60 zufällig ausgewählten Tieren eines Bestandes wurden die Choanen sowie eine definierte Hautstelle betupfert (Flügelunterseite beim Masthähnchen, Halspartie bei der Pute).

Tierumgebung im Stall

In jedem Tierstall wurde von mindestens fünf verschiedenen Stellen eine Sammelstaubprobe mit Hilfe eines sterilen Pinsels entnommen sowie je eine Futter- bzw. Kotsammelprobe aus dem Haltungsbereich der Tiere entnommen. Zusätzlich wurde Staub über mehrere Wochen auf einem Sedimentationsblech in etwa 2 m Höhe über dem Stallboden gesammelt. Die Untersuchung des Stallganges erfolgte mittels Sockentupferproben durch Abschreiten seiner Gesamtlänge. In den Geflügelbetrieben wurde zusätzlich die Einstreu analysiert.

Luftproben

Zum Nachweis und zur Quantifizierung luftgetragener MRSA wurden im Tierstall Luftprobenahmen via Impingement und Filtration mittels Polycarbonatfilter durchgeführt. Die Apparaturen wurden in einer Höhe von 1,50 m angebracht und gleichmäßig an drei repräsentativen Stellen im Stall verteilt. Die Probenahmezeit betrug beim Impingement 30 Minuten mit einer Luftdurchflussrate von ca. 11,5-12,5 l/min bzw. bei der Filtration 150 Minuten mit einer Durchflussrate von 2,5 l/min.

Außerhalb des Tierstalls

Analog zu den Untersuchungen im Stallinneren wurde die Umgebung zur Beurteilung einer möglichen Emission von MRSA aus den Tierställen beprobt. Dazu wurden Luftproben in einer Entfernung von 50 m und 150 m auf der windabgewandten Seite (Lee), sowie in 100 m auf der windzugewandten Seite (Luv) des parallel untersuchten Stalles gesammelt. Die Entnahmezeit betrug beim Impingement 90 Minuten mit einer Luftdurchflussrate von ca. 11,5-12,5 l/min bzw. bei der Filtration 150 Minuten mit einer Durchflussrate von 2,5 l/min. Stallumgebende Bodenoberflächen wurden durch das Abschreiten von 50 m mittels Sockentupfer in verschiedenen Entfernungen untersucht. So wurden die Proben, wenn zugänglich, 50 m, 150 m, 300 m und 500 m auf der windabgewandten Seite bzw. 100 m auf der windzugewandten Seite entnommen.

4.1.3 Bearbeitung der Proben

Sämtliches Probenmaterial wurde zunächst einem zweistufigen selektiven Kultivierungsverfahren unterzogen. Nach einer Voranreicherung in Müller-Hinton-Bouillon versetzt mit 6,5 % NaCl erfolgte eine anschließende Selektivanreicherung in Trypton-Soja-Bouillon mit 75 mg/l Aztreonam und 3,5 mg/l Cefoxitin.

Am Ende des Anreicherungsverfahrens erfolgte der Ausstrich auf einem chromogenen Selektivmedium (CHROMagar™ MRSA, MAST Diagnostica GmbH) zur Isolierung und Differenzierung Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*. Bei einem MRSA-typischen Wachstum (malvenfarbene Kolonien) wurden bis zu fünf verdächtige Kolonien auf Schafblutagar subkultiviert, inkubiert und zur weiteren Differenzierung auf das Vorhandensein der Koagulase getestet. Mittels einer Duplex-Real-Time PCR nach PASANEN et al. (2010) erfolgte der Nachweis von MRSA durch Detektion des *nuc* Gens (spezifisch für *Staphylococcus aureus*) bzw. des *mecA* Gens (spezifisch für die Methicillinresistenz). MRSA-positiv identifizierte Bakterienstämme wurden anschließend in CRYOBANK™-Kryoröhrchen bei -80°C asserviert.

4.1.4 Auswahl der Isolate

Um der Fragestellung einer luftgetragenen Verbreitung von MRSA aus Nutztierställen nachzugehen und darüberhinaus einen möglichen Eintrag in die Umwelt ermitteln zu können, wurden ausgewählte Isolate aus dem Innen- und Außenbereich der Tierbestände im Zuge dieser Arbeit mittels molekularer Typisierungsmethoden weiterführend charakterisiert.

Dafür wurden zunächst 238 ausgewählte MRSA-Isolate *spa*-typisiert sowie ihre Zugehörigkeit zum Clonal Complex CC398 bzw. anderen Sequenztypen bestimmt. Für 124 Isolate, davon 60 aus Schweine-, 34 aus Masthähnchen- sowie 30 aus Putenmastbeständen, erfolgte dann eine klonale Verwandtschaftsanalyse mittels Makrorestriktion und anschließender Pulsfeldgelelektrophorese. Die Auswahl der Stämme aus Schweinemastbeständen erfolgte anhand der Probenahmezeitpunkte. Um emittierte und sedimentierte MRSA-Stämme unter wechselnden Umweltbedingungen zu vergleichen, wurden Isolate sowohl aus Sommer- und Winterprobenahmen untersucht. Da in den Geflügelbeständen die Beprobung nicht pro Quartal, sondern mehrmals innerhalb eines Mastdurchgangs erfolgte, wurden hier wiederum Isolate aus den letzten Probenahmen und dem damit erreichten Mastende der Tiere ausgewählt. Zusätzlich wurde für insgesamt 38 der 124 zuvor PFGE-typisierte MRSA-Stämme eine weiterführende genotypische Charakterisierung durch Einsatz eines *S. aureus* spezifischen DNA-Microarrays durchgeführt. Weiterhin erfolgte für die 34 PFGE-typisierten MRSA-Stämme aus den Masthähnchenbeständen eine Proteomanalyse mittels MALDI-TOF-MS.

4.2 Molekularbiologische Untersuchungsverfahren

4.2.1 DNA-Extraktion - asservierte Isolate

Ausgewählte Bakterienisolate wurden mittels Drei-Ösen-Ausstrich auf Columbia Agar vereinzelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Extraktion der genomischen DNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers mittels des nexttec™ DNA-Extraktions-Kit. Abschließend wurde die extrahierte DNA aliquotiert und bei -20 °C in Reaktionsgefäße gelagert.

4.2.2 *spa*-Typisierung

In einer konventionellen PCR wurden die am 3'-Ende des Proteins A befindliche „polymorphe Region X“ vervielfältigt und anschließend sequenziert. Jeder einzelnen Repeat-Sequenz wird ein sogenannter alphanumerischer Code zugewiesen (z.B. GAGGAAGACAACAACAAACCTGGT = 07), aus dessen Art und Abfolge sich dann der jeweilige *spa*-Typ ergibt (<http://www.spaserver.ridom.de>).

4.2.2.1 Durchführung der PCR

Der Reaktionsansatz ergab nach Zugabe von Proben-DNA bzw. Positiv- und Negativkontrolle ein Gesamtvolumen von 25 µl pro Mikroreaktionsgefäß und setzte sich laut Tabelle 3 wie folgt zusammen:

Tabelle 3: Pipettierschema für den PCR-Reaktionsansatz zur *spa*-Typisierung

Zusammensetzung Reaktionsansatz	Volumen
DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2x)	12,5 µl
<i>spa</i> -1113f (10 pmol/µl)	0,25 µl
<i>spa</i> -1514r (10 pmol/µl)	0,25 µl
Nuklease-freies Wasser	10 µl
Volumen Reaktionsansatz	23 µl
Zugabe Proben-DNA, Positiv- und Negativkontrolle	2 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Als Negativkontrolle wurde Nuklease-freies Wasser eingesetzt (No-Template-Control).

Nach anschließender Zentrifugation wurde die PCR in einem Thermocycler gemäß dem in Tabelle 4 aufgeführten Programm durchgeführt.

Tabelle 4: Temperatur-Zeit-Programm zur Amplifikation des *spa*-Gens

Programmschritt	Temperatur in °C	Zeit in min
Initiale Denaturierung	96	05:00
Denaturierung	94	00:30
Annealing	62	00:30
Extension	72	01:30
Finale Extension	72	10:00
Kühlung	4	∞

4.2.2.2 Gelelektrophorese und Dokumentation

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 100 ml eines 1,2 % Agarosegels hergestellt, das nach dem Abkühlen im Wasserbad bei 55 °C mit 4 µl (0,004%) Midori Green versetzt wurde. Als Molekulargewichtstandard fand der Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (100- 3000 bp) Anwendung. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V für 60 min mit anschließender Visualisierung des Gels unter UV-Licht mittels Molecular Imager®.

4.2.2.3 DNA-Sequenzanalyse

Mit dem innuPREP PCRpure Kit wurden die PCR-Produkte in einem Zwei-Schritt-Verfahren nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die anschließende Sequenzierung erfolgte durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin). Mit dem Computerprogramm Bionumerics (Version 6.6) wurden entsprechende Sequenzdateien importiert, ermittelte Repeats ausgelesen und *spa*-Typen identifiziert.

4.2.3 PCR zur Bestätigung der Zugehörigkeit zum Clonal Complex (CC) 398

Mittels der von STEGGER et al. (2011) beschriebenen stammspezifischen PCR für *S. aureus* CC398 wurden ausgewählten MRSA-Isolate bezüglich ihrer Zugehörigkeit zum klonalen Komplex CC398 untersucht.

4.2.3.1 Durchführung der PCR

Der Reaktionsansatz ergab nach Zugabe von Proben-DNA bzw. Positiv- und Negativkontrolle ein Gesamtvolumen von 25 µl pro Mikroreaktionsgefäß und setzte sich laut Tabelle 5 wie folgt zusammen:

Tabelle 5: Pipettierschema für den PCR-Reaktionsansatz zur Bestätigung des CC398

Zusammensetzung Reaktionsansatz	Volumen
DreamTaq™ Green PCR Master Mix	12,5 µl
forward universal <i>sau1-hsdS1</i>	0,5 µl
AF primer (10pmol/µl)	
CC398r1(10pmol/µl)	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	9,5 µl
Volumen Reaktionsansatz	23 µl
Zugabe Proben-DNA, Positiv- und Negativkontrolle	2 µl
Gesamt	25 µl

Nach anschließender Zentrifugation wurde die PCR in einem Thermocycler gemäß dem in Tabelle 6 aufgeführten Programm durchgeführt.

Tabelle 6: Temperatur-Zeit-Programm zur Amplifikation *sau1-hsdS1*-Gens

Programmschritt	Temperatur in °C	Zeit in min
Initiale Denaturierung	95	12:00
Denaturierung	95	00:30
Annealing	61	00:30
Extension	72	01:00
Finale Extension	72	10:00
Kühlung	4	∞

Die Durchführung der Gelelektrophorese mit anschließender Dokumentation erfolgte wie unter Punkt 4.2.2.2 beschrieben. Beim Vorhandensein einer Bande in der Größenordnung von 296 bp, wurde die Reaktion als positiv gewertet und das jeweilige Isolat dem CC398 zugeordnet.

4.2.4 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Beim Verfahren der Multilocus-Sequenz-Typisierung für *Staphylococcus aureus* werden mittels konventioneller PCR interne Fragmente von sieben sogenannten Housekeeping-Genen (siehe Tabelle 2) vervielfältigt und nach anschließender Aufreinigung sequenziert und ausgewertet.

4.2.4.1 Durchführung der PCR für die MLST

Der Reaktionsansatz ergab nach Zugabe von Proben-DNA bzw. Positiv- und Negativkontrolle ein Gesamtvolumen von 50 µl pro Mikroreaktionsgefäß und wurde gemäß Tabelle 7 hergestellt. Dabei war es nötig, diesen Arbeitsschritt mit jedem in Tabelle 2 beschriebenen Primer-Paar durchzuführen.

Tabelle 7: Pipettierschema für den PCR-Reaktionsansatz zur MLST

Zusammensetzung Reaktionsansatz	Volumen
DreamTaq™ Green PCR Master Mix	25 µl
Primer-forward (10pmol/µl)	2,5 µl
Primer-reverse (10pmol/µl)	2,5 µl
Nuklease-freies Wasser	19 µl
Volumen Reaktionsansatz	49 µl
Zugabe Proben-DNA, Positiv- und Negativkontrolle	1 µl
Gesamt	50 µl

Nach anschließender Zentrifugation wurde die PCR in einem Thermocycler gemäß dem in Tabelle 8 aufgeführten Programm durchgeführt.

Tabelle 8: Temperatur-Zeit-Programm zur Amplifikation der sieben Housekeeping-Gene *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *tpi* sowie *yqil*

Programmschritt	Temperatur in °C	Zeit in min
Initiale Denaturierung	95	05:00
Denaturierung	95	01:00
Annealing	55	01:00
Extension	72	01:00
Finale Extension	72	05:00
Kühlung	4	∞

Die Durchführung der Gelelektrophorese mit anschließender Dokumentation erfolgte wie unter Punkt 4.2.2.2 beschrieben. Die Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte wurde wie unter Punkt 4.2.2.3 beschrieben, durchgeführt. Mittels des Computerprogramms BioNumerics (Version 6.6) wurden importierte Sequenzdateien automatisch analysiert und durch online Verknüpfung zur MLST-Datenbank entsprechenden Allelnummern bzw. Sequenztypen zugeordnet.

4.2.5 Makrorestriktionsanalyse mit anschließender Pulsfeldgelelektrophorese für den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* ST398

Die Durchführung der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field – Pulsfeldgelelektrophorese (CHEF-PFGE) wurde gemäß einem leicht modifizierten Protokoll von ARGUDÍN et al. (2010) durchgeführt.

Zellpräparationsschritte der in Agarose einzubettenden DNA

Zunächst erfolgte die Kultivierung der kryokonservierten MRSA-Isolate auf einem Hirn-Herz-Agar, der anschließend über Nacht bei 37 °C aerogen inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkolonien vom Nähragar mittels 5 ml TE-1-Puffer abgeschwemmt. Die Messung der Optischen Dichte (OD) der Bakteriensuspension erfolgte in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm. Um eine ausreichende Menge an DNA zu erhalten, wurde eine OD von 1,5 mit TE-1-Puffer eingestellt. Im Anschluss daran wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension für 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 500 µl TE-1-Puffer gelöst. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Zum Aufschluss der Bakterienzelle mussten 200 µl des resuspendierten Pellets in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 4 µl Lysostaphin Lösung (1mg/ml) versetzt werden. Nach mehrfachem auf- und abpipettieren der Suspension erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei 200 rpm und einer Temperatur von 37° C im Thermomixer. Zur Herstellung der Agaroseblöckchen wurden eine 1,8 %ige Biozym LE GP Agarose verwendet. 200 µl der Gellösung wurden dann zu 200 µl der Keimsuspension gegeben und vorsichtig mit der Pipette durchmischt. Nun wurde die Menge in die vorbereiteten Gießformen überführt, wo sie anschließend für ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur aushärtete. Durch Einbettung in Agarose wird die DNA vor molekularen Scherkräften geschützt.

Proteinverdau

Die ausgehärteten Agaroseblöckchen wurden anschließend in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit 2 ml ESP-Puffer sowie 1mg/ml frisch hergestellter Proteinase K-Lösung versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 55°C und 200 rpm im Thermomixer. Um neben der Proteinase K auch Zellablagerungen zu entfernen, erfolgte am nächsten Tag das Waschen der über Nacht inkubierten Blöckchen.

An ein zweimaliges Waschen mit 1 ml vorgewärmten Reinstwasser schloss sich sechsmal Waschen mit 1 ml vorgewärmten TE-2-Puffer im Thermomixer für jeweils 15 Minuten bei 50°C und 300 rpm an. Abschließend wurden die Agaroseblöckchen in neue Reaktionsgefäße gegeben, die mit 1 ml TE-2-Puffer versetzt waren. Auf diese Weise ließen sie sich bis zum Gebrauch bzw. längstens 6 Monate bei 4°C lagern.

Restriktionsenzymverdau

Mit Hilfe eines Metallspatels wurde ein Drittel des Blöckchens abgetrennt und in 1x *Cfr9I*-Puffer für ca. 30 Minuten äquilibriert. Anschließend wurde der Restriktionspuffer abpipettiert und der Ansatz für den Restriktionsenzymverdau in Reaktionsgefäße überführt. Dieser setzte sich aus 10 µl *Cfr9I*-Puffer (10x), 90 µl Reinstwasser sowie 3 µl *Cfr9I* Restriktionsenzym zusammen. Am Ende wurde der Reaktionsansatz durch mehrfaches auf- und abpipettieren nochmals gut durchmischt und für 16 h bei 37 °C und 200 rpm im Thermomixer inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Enzymlösung verworfen und das Blöckchen in 100 µl 0,5xTBE bei 4 °C für 30 min äquilibriert.

Gelelektrophorese und Gelfärbung

Nun konnten die Agaroseblöckchen vorsichtig mit einem Metallspatel auf den Gelkamm platziert werden. Dieser wurde dann in den vorbereiteten Gießrahmen gesetzt und langsam mit 100 ml eines 1,2 %igen SeaKem® Gold Agarosegels befüllt. Die Platzierung des Molekulargewichtsstandard NCTC 8325 erfolgte in die beiden äußeren sowie in die mittlere Spur. Nach 30-minütiger Aushärtung des Gels wurde dieses in die Mitte der CHEF-DR® III Pulsfeldgelelektrophorese-Kammer eingesetzt. Nun wurde die Kammer mit 2 l Laufpuffer (0,5xTBE) befüllt, das Cooling Module auf 14 °C und die Pumpgeschwindigkeit auf 70 (entspricht in etwa 0.75 l/min) eingestellt. Erst nach einstündiger Äquilibrierung des Agarosegels im Laufpuffer wurde das Power Module gestartet. Bei der CHEF-PFGE sind insgesamt 24 Elektroden hexagonal um das Agarosegel angeordnet, wobei das elektrische Feld zwischen einander gegenüberliegenden Elektroden durch ein Kontrollgerät angelegt wird. Dabei ist um jeweils +60° bzw. -60° die Richtung der elektrischen Feldvektoren gegenüber der Richtung der vertikalen Achse des Gels verschoben. Die Laufbedingungen für PFGE sind in der Tabelle 9 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 9: PFGE-Laufbedingungen für MRSA ST398

Laufbedingungen	
Kühltemperatur Cooling-Module	14 °C
Spannung	6 V/cm
Winkel	120 °
Pulszeit Block 1*	5-50 s
Laufzeit*	20,5 h
Pumpgeschwindigkeit	70

* Modifikation des HARMONY PFGE Protokolls nach MURCHAN et al., 2003

Abschließend wurde das Agarosegel in 300 ml einer Gel Red™ Färbelösung für 30 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur angefärbt.

Auswertung der Restriktionsprofile

Die Restriktionsprofile wurden mit Hilfe einer UV-Kamera visualisiert und dokumentiert. Anhand der generierten Makrorestriktionsmuster wurde mit dem Computerprogramm BioNumerics (Version 6.6) die klonale Verwandtschaftsanalyse durchgeführt und zwar mit einer Optimierung von 0,6%, einer Positionstoleranz von 1,5% und Dice-Einstellung für den Koeffizienten-Vergleich. Das auf der „Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean“ (UPGMA) basierende Clusterverfahren war dabei die Auswertungsgrundlage. Bei einer Übereinstimmung von $\geq 85\%$ wurden entsprechende MRSA-Stämme als verwandt anerkannt (TENOVER et al., 1995; CARRICO et al., 2005).

4.2.6 Microarray-Analyse

Mittels eines speziell für *Staphylococcus aureus* entwickelten DNA-Microarrays (*S. aureus* ArrayStrip™) erfolgte für ausgewählte MRSA-Isolate eine weiterführende genotypische Charakterisierung. Der Microarray enthält auf seiner Oberfläche über 300 klinisch relevante speziesbezogene Marker sowie eine Vielfalt an Resistenz- und Virulenz –assoziierten Genen als Hybridisierungssonden (Proben-DNA) auf einer Immobilisierungsmatrix. Mittels des HybridisationPlus Kit wurde nach Herstellerangaben die genomische DNA der *S. aureus*-Stämme in einer Multiplex-PCR linear vervielfältigt, dabei fluoreszenzmarkiert und auf die Array-Oberfläche aufgetragen. Hatte eine Hybridisierung zwischen der einzelsträngigen Target-DNA (Amplifikat) und der immobilisierten Proben-DNA stattgefunden, wurde dies im nachfolgenden Färbeschritt sichtbar. Die Analyse von Fluoreszenzsignale einzelner Hybridisierungssspots erfolgte mittels des ArrayMate™ Readers, der die Ergebnisse automatisch auslas und in einem Berichtsblatt dokumentierte.

4.2.7 Differenzierung der Isolate durch MALDI-TOF-MS

Proteinextraktion

Ausgewählte MRSA-Isolate wurden im Dreifachansatz auf Columbia Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert (biologische Replikate, siehe Abbildung 1). Die anschließende Extraktion der Proteine erfolgte gemäß dem standardisierten Protokoll der Firma Bruker Daltonik GmbH („Ethanol-/Ameisensäure-Extraktion“) mit geringfügigen Modifikationen. Zusammenfassend wurde eine Impföse (ca. 1 g) einer jeden Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß mit 300 µl destilliertem Wasser überführt und anschließend mit 900 µl Ethanol (100%) aufgefüllt und gut durchmischt. Danach erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 13 000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und letzte Reste des überschüssigen Ethanols mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Nun wurden 50 µl Ameisensäure (70%) und 50 µl Acetonitril (100%) zum Pellet hinzugefügt und durch vortexen gut durchmischt. Nach dem Kühlen der Probe auf Eis, erfolgte eine 1-minütige Behandlung mittels Ultraschallprozessor (Zyklus, 1.0; Amplitude, 100%). Im Anschluss wurde die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und im darauffolgenden Schritt bei 13 000 rpm zentrifugiert. Jeweils 1 µl des erhaltenen Überstands wurden als Triplikat auf die Analysespots der MALDI Probenplatte („target plate“) überführt und unter bestehenden Umgebungsbedingungen nach der „dried-droplet“ Methode luftgetrocknet (technische Replikate, siehe Abbildung 1). Im Anschluss daran wurde 1 µl einer gesättigten Matrixlösung (hier α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure) auf entsprechende Probenspots pipettiert. Nach kompletter Trocknung an der Luft erfolgte die MALDI-TOF-MS-Messung. Jeder einzelne Spot wurde dreimal gemessen, so dass insgesamt 27 Massenspektren für jedes zu untersuchende MRSA-Isolat generiert werden konnten (siehe Abbildung 1).

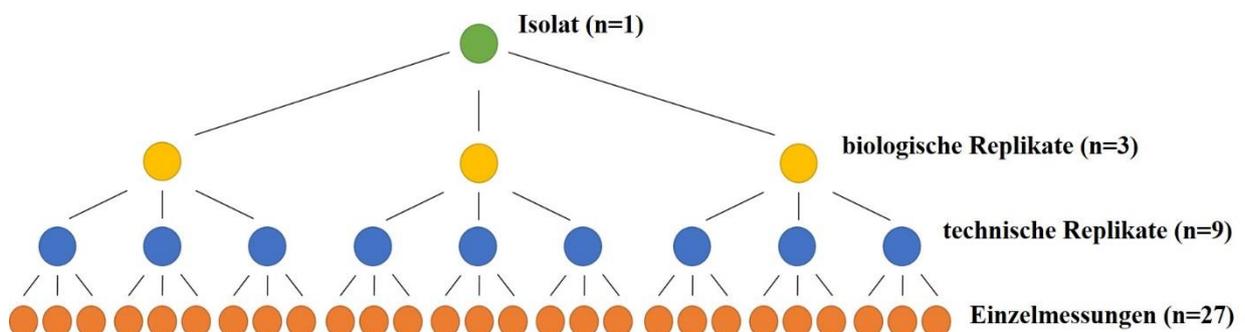


Abbildung 1: Grafische Darstellung der einzelnen Präparationsschritte für die MALDI-TOF-MS Messung

MALDI-TOF MS Messung

Die MALDI-TOF-MS Messung wurde mittels eines Microflex LT Massenspektrometers der Firma Bruker Daltonik GmbH durchgeführt. Vor der ersten Messung wurde das Gerät mit dem empfohlenen Bakterienreferenzstandard kalibriert. Die Geräteparameter lauteten dabei wie folgt: Ionenquelle 1 bei 20 kV, Ionenquelle 2 bei 16,3 kV, Linsenspannung bei 7 kV, verzögerte Ionenextraktion von 200 ns, initiale Laserstärke von 30 % und maximale Laserstärke von 40 % sowie einem Laser-Abschwächungsversatz von 38 % (Schwellenwert, 30 %). Der Aufnahmebereich wurde festgesetzt auf 2.000–20.000 Da. Für jedes Spektrum wurden 240 Laserschüsse ausgeführt, von denen 40 Schüsse mittels der FlexControl 3.0 Software automatisch ermittelt und auf diese Weise immer eine andere Position des Analysespots gemessen wurden („random walk movement“).

Im Anschluss an die Messung wurde die Qualität eines jeden Spektrums mittels der FlexAnalysis 3.0 Software überprüft. Dazu wurden die 27 generierten Massenspektren einer detaillierten Visualisierung durch „Baseline Subtraction“, „Smoothing“ und „Peak Picking“ unterzogen. Durch den Vorgang der Baseline Subtraction (TopHat Algorithmus) kann eine Kontrastverstärkung von Peaks eines Spektrums bezüglich ihrer Höhe und Form realisiert werden. Besitzen identische Proteine abweichende Massen- und Ladungswerte können sie durch den Vorgang des Smoothing (Savitzky Golay Algorithmus) bzw. der Rekalibrierung trotzdem als identisch identifiziert werden. Wie viele Peaks durch das sogenannte Peak Picking definiert und in die daraus resultierende Peaklist integriert werden, wird über die manuell einstellbare Auflösung des Software-Algorithmus bestimmt (siehe Abbildung 2). Die generierten Massenspektren sind charakteristisch für die untersuchte Bakterienspezies und stellen eine Art „molekularen“ Fingerabdruck dar, der die Grundlage für die weitere Auswertung mittels Biotyper 3.0 Software bildet. Hier werden die ermittelten Massenspektren mit einer im System integrierten Referenzdatenbank verglichen und eine sogenannte Main Spectra Library (MSP) für die untersuchten MRSA-Isolate auf Grundlage der voreingestellten Software-Parameter erstellt. Der Vorgang, bei dem die Peaks der unbekannt Probe, mit denen des Referenzstamms verglichen werden, wird „pattern matching“ genannt (siehe Abbildung 3). Während die Farbe Grün exakte Übereinstimmungen anzeigt, steht die Farbe Gelb für annähernde Übereinstimmungen und Rot für fehlende Übereinstimmungen.

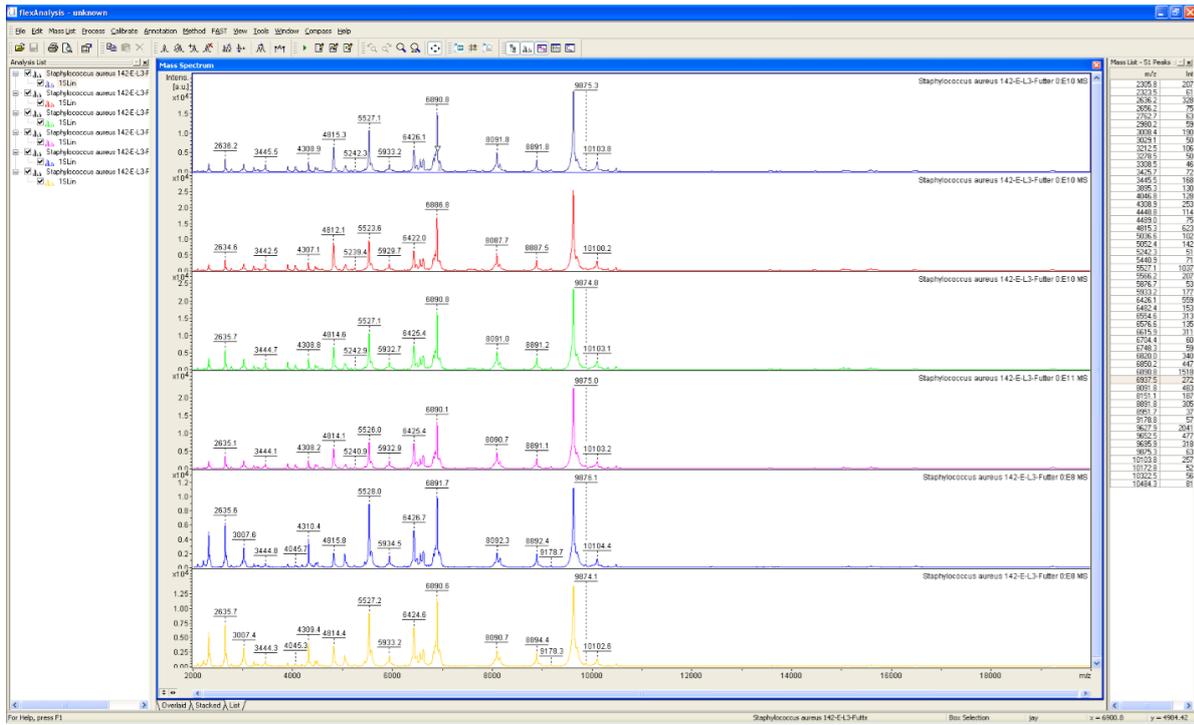


Abbildung 2: Datenauswertung mittels FlexAnalysis 3.0 Software

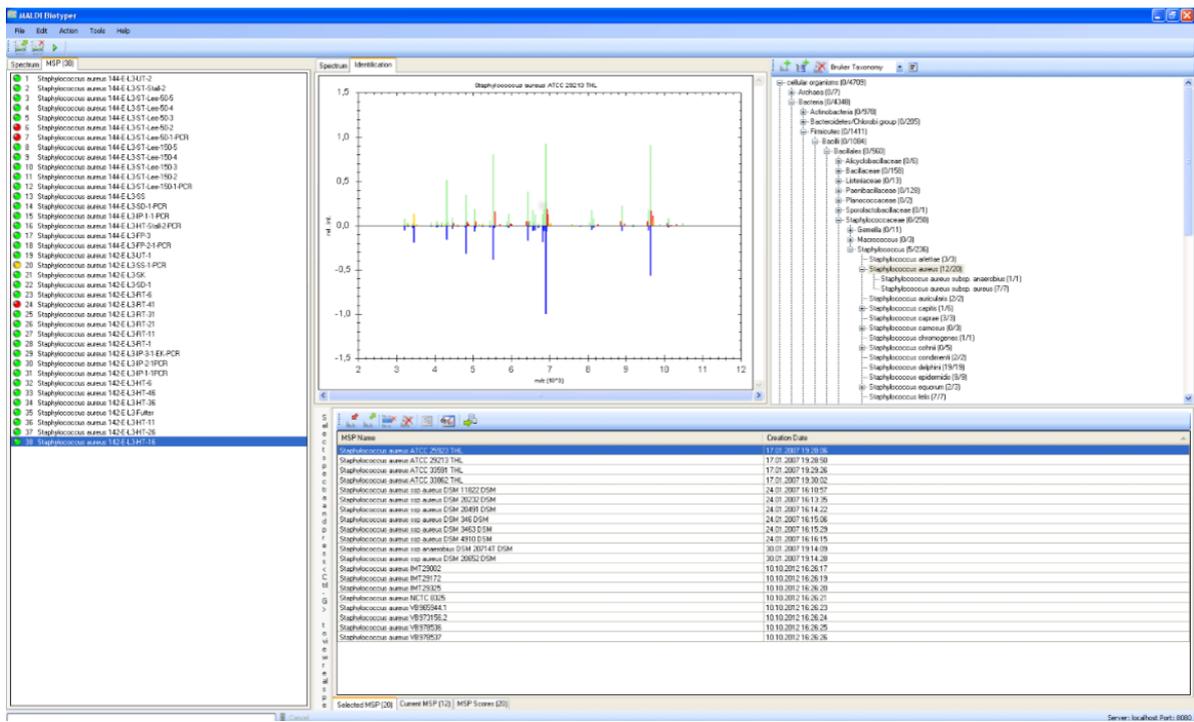


Abbildung 3: Auswertungsschema der Biotyper 3.0 Software

Composite-Correlation-Index (CCI)

Der Composite Correlation Index (CCI) wurde als statistisches Tool der MALDI Biotyper Software verwendet, um Übereinstimmungen zwischen generierten Massenspektren festzustellen. Dabei handelt es sich um einen modifizierten mathematischen Algorithmus (ARNOLD & REILLY, 1998), der Spektrenvariationen innerhalb und zwischen einzelnen Messreihen der MALDI-TOF-MS Datenanalyse beurteilt. Die Berechnung des CCI erfolgt nach voreingestellten Standardparametern der Biotyper 3.0 Software (3000 – 12000 Da, Auflösung 4, 4 Intervalle und Autocorrelation aus) und erstellt eine sogenannte „Correlation-Matrix“ (HeatMap) von den untersuchten Isolaten (siehe Abbildung 4). Während die Farbe Rot auf sehr enge Übereinstimmungen zwischen den Spektren hindeutet, weist die Farbe Blau auf deutliche Unterschiede zwischen diesen hin.

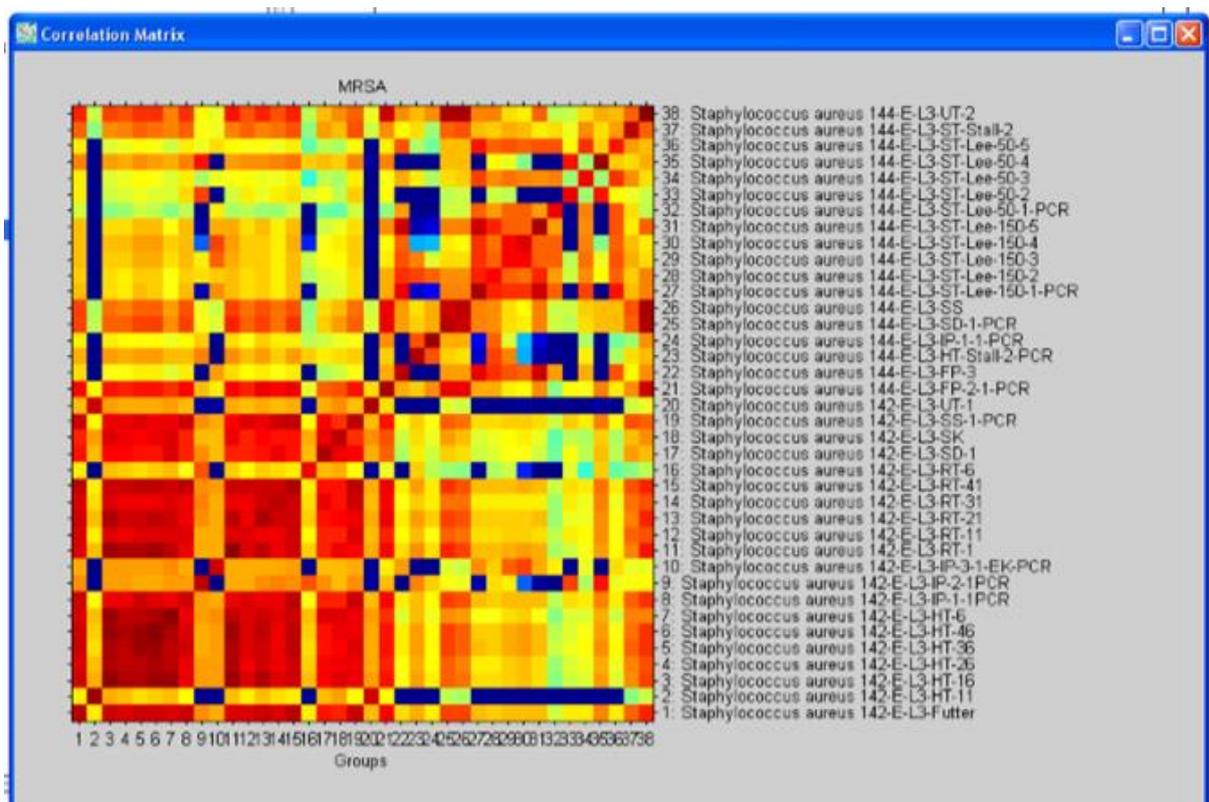


Abbildung 4: Correlation-Matrix ermittelter CCI-Werte: Spektren mit einer engen Beziehung zueinander wurden in „warmen“ (gelb bis rot) Farben und solche mit deutlichen Unterschieden in „kalten“ (grün bis blau) Farben dargestellt.

Clusteranalyse der mittels MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren

Im Vorfeld muss darauf hingewiesen werden, dass es sich hier um eine erste orientierende Untersuchung handelt.

Zunächst wurden für die Durchführung der Clusteranalyse von jedem MRSA-Isolat zufällig sechs der insgesamt 27 mittels MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren ausgewählt. Durch Einsatz der Software UltraMassList erfolgte im Anschluss die Umwandlung der in der FlexAnalysis Software gespeicherten Peak-Listen der ausgewählten Massenspektren in Textdateien. Alle wichtigen Informationen eines Spektrums sind in einer solchen Peaklist enthalten, so z.B. das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis oder die Intensität der einzelnen Spektren (siehe Abbildung 2). Entsprechende Textdateien wurden anschließend in die Software MS-Screener importiert, die von sämtlichen Spektren eine sogenannte Peak-Matrix als Textdatei erstellte. Diese finalen Textdateien konnten schließlich in die Software PAST importiert werden. Die abschließende Clusteranalyse erfolgte wie auch bei der Auswertung der PFGE-Restriktionsprofile auf Grundlage der „Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean“ (UPGMA) sowie des Dice-Ähnlichkeitskoeffizienten.

Da es sich, wie bereits erwähnt, um eine erste orientierende Untersuchung handelt, war es nötig, einen vorläufigen Grenzwert („Cut-Off“) zur Auswertung der Clusteranalyse festzusetzen, wobei wie folgt vorgegangen wurde:

In einem ersten Schritt wurden insgesamt zwei Gruppen definiert und zwar Gruppe A und B. Konnten alle sechs generierten Massenspektren eines Isolates in einem gemeinsamen Cluster detektiert werden, wurden diese Gruppe A zugeordnet. Konnten jeweils fünf der sechs generierten Massenspektren eines Isolates in einem gemeinsamen Cluster detektiert werden, wurden diese wiederum Gruppe B zugeordnet.

Da in der PAST-Software bisher keine Detailansicht verfügbar ist, in der die Ähnlichkeitswerte als Zahlenwerte dargestellt werden können, musste eine zusätzliche Auswertung per Hand erfolgen. Die dabei ermittelten Ähnlichkeitswerte wurden zur besseren Visualisierung in das mittels PAST-Software generierte Dendrogramm in Anlage 1 (siehe Anhang) eingetragen und in den Tabellen 10 und 11 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 10: Ermittelte Ähnlichkeitswerte für die Gruppe A

Cluster	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	ΣG
Isolat	24	21	27	13	11	17	29	34	30	5	16	10	19	32	-
Ähnlichkeit	0,58	0,69	0,79	0,73	0,80	0,79	0,71	0,69	0,57	0,80	0,83	0,71	0,71	0,80	10,2

Tabelle 11: Ermittelte Ähnlichkeitswerte für die Gruppe B

Cluster	B1	B2	B3	B4	B5	B6	ΣG
Isolat	26	6	12	14	1	25	-
Ähnlichkeit	0,70	0,70	0,84	0,75	0,85	0,79	4,63

Zur Festsetzung eines orientierenden Grenzwertes erfolgte anschließend die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes (\bar{x}). Dazu wurden in einer Nebenrechnung die Summen der einzelnen Ähnlichkeitswerte aus Gruppe A (ΣA) und Gruppe B (ΣB) addiert und schließlich durch die Gesamtanzahl ermittelter Ähnlichkeitswerte geteilt (ΣG). Auf Grundlage des errechneten arithmetischen Mittelwertes ($\bar{x} = 0,7415$) wurde somit ein vorläufiger Grenzwert von 0,74 festgesetzt (siehe Nebenrechnung).

Nebenrechnung:

$$\bar{x} = \frac{\Sigma A + \Sigma B}{\Sigma G} = \frac{10,2 + 4,63}{20} = 0,7415$$

Nur Isolate, deren sechs Massenspektren in einem gemeinsamen Cluster vorlagen und eine Übereinstimmung von über 0,74 zeigten, wurden im Zuge dieser ersten Orientierungsuntersuchung als ähnlich eingestuft.

5 Ergebnisse

5.1 *spa*-Typisierung

Zur Detektion von möglichen Verwandtschaften zwischen einzelnen MRSA-Stämmen und zur Analyse ihres Vorkommens im Tierstall und der Stallumgebung wurden 238 MRSA-Isolate aus vier Schweinmast- und zwei Schweinezuchtbetrieben sowie zwei Masthähnchen- und vier Putenmastbetrieben mittels *spa*-Typisierung weiterführend molekularbiologisch charakterisiert. Tabelle 12 zeigt eine Zusammenfassung der ermittelten *spa*-Typen sowie deren Abfolge von sich wiederholenden Sequenzabschnitten (Repeats). Zur Verdeutlichung von genetischen Zusammenhängen zwischen den ermittelten *spa*-Typen wurden sich wiederholende Repeat-Sequenzen farblich markiert.

Tabelle 12: Übersicht ermittelter *spa*-Typen und deren Repeatprofile

<i>spa</i>-Typ	Repeatprofil
t011	08-16-02-25-34-24-25
t1451	08-16-02-25-34-25
t108	08-16-02-25-24-25
t1250	08-16-02-25-02-25
t3479	08-16-02-25-24-24-25
t034	08-16-02-25-02-25-34-24-25
t5452	08-02-25-34-25
t1580	08-02-25-34-24-25
t1344	08-24-25
t899	07-16-23-02-34
t1430	07-16-23-02-12-23-02-34
t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16

5.1.1 Geflügelmastbestände

Insgesamt wurden 106 MRSA-Isolate, 65 aus vier Putenmast- und 41 aus zwei Masthähnchenbeständen, typisiert. Entsprechende Ergebnisse sind für die Putenmast- und Masthähnchenbestände getrennt voneinander in den Tabellen 13 und 14 dargestellt.

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen die Verteilung der MRSA-Isolate im Tierstall und der Stallumgebung.

- Putenmastbestände –

Im Ergebnis dominierten die *spa*-Typen t011 und t5452 mit einem Anteil von insgesamt 78,5 %, gefolgt von t034 mit einem Anteil von 12,3 %. Die Nachweisrate für die *spa*-Typen t002 (n=3), t1250 (n=2) und t1430 (n=1) fiel mit 9,2 % vergleichsweise geringer aus (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Vorkommen und prozentuale Verteilung ermittelter *spa*-Typen aus Putenmastbeständen

<i>spa</i> -Typ	Absolute Häufigkeit (n)	Vorkommen in %
t011	29	44,6
t5452	22	33,9
t034	8	12,3
t002	3	4,6
t1250	2	3,1
t1430	1	1,5
Gesamt	65	100

Abbildung 5 zeigt, dass die dominierenden *spa*-Typen t011, t5452 und t034 sowohl im Tierstall als auch in der Stallumgebung nachgewiesen wurden, während die Typen t002, t1250 sowie t1430 entweder nur im Innen- oder nur im Außenbereich der Bestände vorkamen.

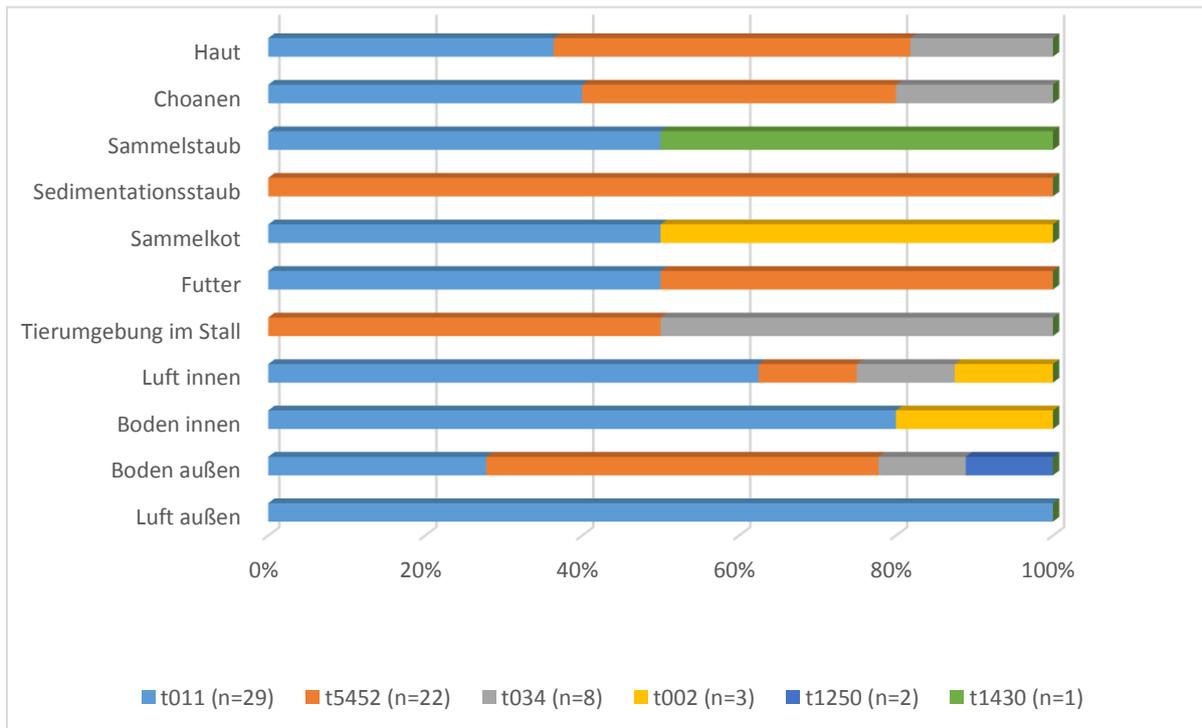


Abbildung 5: Verteilung der *spa*-Typen unter den verschiedenen Probenarten aus dem Innen- und Außenbereich der Putenmastbestände

- Masthähnchenbestände -

In den zwei untersuchten Masthähnchenbeständen kamen am häufigsten die *spa*-Typen t1430 (53,7 %), t034 (21,9 %) und t108 (12,2 %) vor. Der *spa*-Typ t899 (n=4) war mit einem prozentualen Anteil von 9,8 % vertreten, während t1580 einmalig auftrat (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Vorkommen und prozentuale Verteilung ermittelter *spa*-Typen aus Masthähnchenbeständen

<i>spa</i> -Typ	Absolute Häufigkeit (n)	Vorkommen in %
t1430	22	53,7
t034	9	21,9
t108	5	12,2
t899	4	9,8
t1580	1	2,4
Gesamt	41	100

In Abbildung 6 wird gezeigt, dass der dominierende *spa*-Typ t1430 vor allem im Tierstall; aber auch in der Stallumgebung vorkam. Während der *spa*-Typ t899 innen und außen nachgewiesen wurde, waren die übrigen ermittelten Typen t034, t108 und t1580 entweder nur innen oder außen detektierbar.

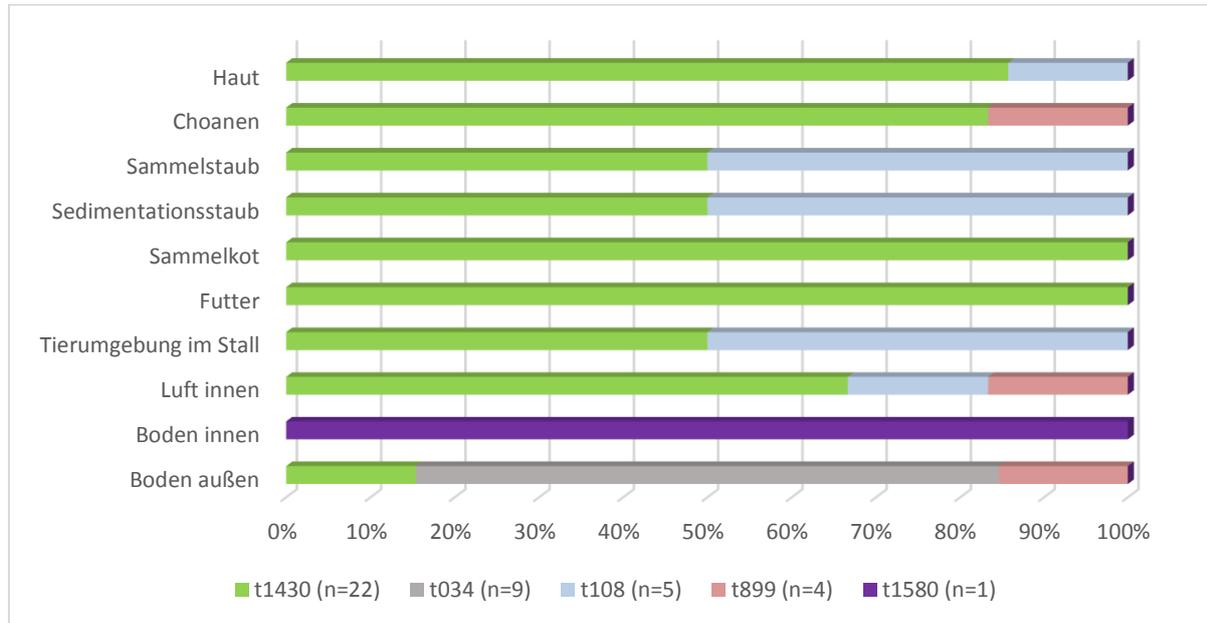


Abbildung 6: Verteilung der *spa*-Typen unter den verschiedenen Proben aus dem Innen- und Außenbereich der Masthähnchenbestände

5.1.2 Schweinebestände

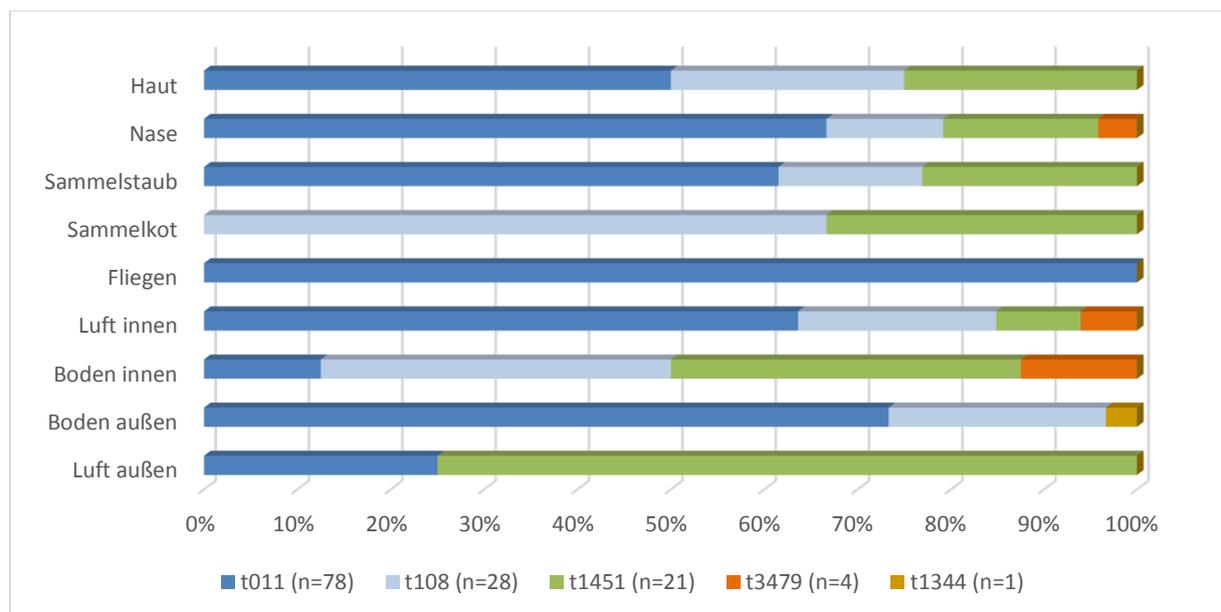
Insgesamt wurden 132 MRSA-Isolate, 98 aus vier Schweinemast- und 34 aus zwei Schweinezuchtbeständen mittels *spa*-Typisierung charakterisiert (siehe Tabelle 15). Alle Isolate aus den Schweinezuchtbeständen gehörten ausnahmslos dem *spa*-Typ t011 an, wohingegen in den Schweinemastbeständen die Typen t011 (n=44), t108 (n=28) und t1451 (n=21) mit einem Anteil von 94,9 % dominierten. Die Nachweisrate für die *spa*-Typen t3479 und t1344 fiel mit 5,1 % vergleichsweise geringer aus.

Tabelle 15: Übersicht ermittelter *spa*-Typen aus den Schweinezucht- und Schweinemastbeständen und deren prozentuale Verteilung

<i>spa</i> -Typ	Absolute Häufigkeit (n)	Vorkommen in %
<i>Schweinezuchtbestände</i>		
t011	34	100
Gesamt	34	100

<i>spa</i> -Typ	Absolute Häufigkeit (n)	Vorkommen in %
<i>Schweinemastbestände</i>		
t011	44	44,9
t108	28	28,6
t1451	21	21,4
t3479	4	4,1
t1344	1	1
Gesamt	98	100

Mit Ausnahme der *spa*-Typen t3479 und t1344, die entweder nur im Tierstall bzw. nur in der Stallumgebung vorkamen, waren die dominanten Typen t011, t108 und t1451 sowohl im Innen- als auch im Außenbereich der Schweinebestände detektierbar (siehe Abbildung 7).

**Abbildung 7:** Verteilung der *spa*-Typen unter den verschiedenen Probenarten aus dem Innen- und Außenbereich der Schweinebestände

5.2 Zugehörigkeit der MRSA-Isolate zum Clonal Complex 398

Im Anschluss wurden alle *spa*-typisierten MRSA-Isolate hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zum CC398 mittels Polymerasekettenreaktion getestet. Während sich alle Isolate aus den Schweinebeständen (n=132) ausnahmslos CC398 zuordnen ließen, war dies in den Masthähnchenbeständen bei 15 von 41 Isolaten (37 %) und in den Putenmastbeständen bei 61 von 65 Isolaten (94 %) möglich. Demzufolge gehörten 30 MRSA-Isolate aus den untersuchten Geflügelmastbeständen nicht dem CC398 an (siehe Punkt 5.3). Tabelle 16 zeigt eine Übersicht über die in den verschiedenen Tierbeständen detektierten *spa*-Typen, die laut den PCR-Typisierungsergebnissen mit dem klonalen Komplex CC398 assoziiert sind.

Tabelle 16: Übersicht CC 398 assoziierter *spa*-Typen aus verschiedenen Tierbeständen

Tierbestände	<i>spa</i>-Typen
Putenmastbestände	t011, t5452, t034, t1250
Masthähnchenbestände	t034, t108, t1580
Schweinebestände	t011, t108, t1451, t3479, t1344

5.3 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Wie bereits unter Punkt 5.2 beschrieben, handelte es sich bei insgesamt 30 Isolaten um sogenannte Non-CC398 MRSA-Stämme, die nicht dem klonalen Komplex CC398 angehörten. Zu dieser Auswahl zählten 26 Isolate aus Masthähnchenbeständen mit den *spa*-Typen t1430 (n=22) und t899 (n=4) sowie vier Isolate aus Putenmastbeständen mit den *spa*-Typen 1430 (n=1) und t002 (n=3). Es wurde ein Isolat eines *spa*-Typs stellvertretend ausgewählt und mittels MLST-Verfahren weiterführend untersucht. Isolate der *spa*-Typen t1430 und t899 wurden so dem Sequenztyp ST9 und das Isolat des *spa*-Typs t002 dem Sequenztyp ST5 zugeordnet. Die prozentuale Verteilung detektierter Sequenztypen setzte sich unter den 30 MRSA-Isolaten wie folgt zusammen: Während in den Masthähnchenbeständen für alle 26 Non-CC398 Isolate (63 %) eine Zugehörigkeit zu ST9 nachgewiesen wurde, kamen in den untersuchten Putenmastbeständen bei drei Isolaten (5 %) ST5 und bei einem Isolat (1 %) ST9 vor.

5.4 Stammtypisierung ausgewählter MRSA-Isolate mittels Makrorestriktionsanalyse

Um der Frage einer luftgetragenen Verbreitung von MRSA aus bzw. zwischen Nutztierställen und einem eventuellen Eintrag in die Umwelt nachzugehen, wurde eine genetische Verwandtschaftsanalyse bei insgesamt 124 ausgewählten MRSA-Isolaten durchgeführt, wovon 60 aus Schweine-, 34 aus Masthähnchen- und 30 aus Putenmastbeständen stammten (siehe Anhang, Anlage 2). Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die generierten Restriktionsprofile ausgewählter aviärer MRSA-Isolate, die beispielhaft in zwei Gelaufnahmen dargestellt sind.

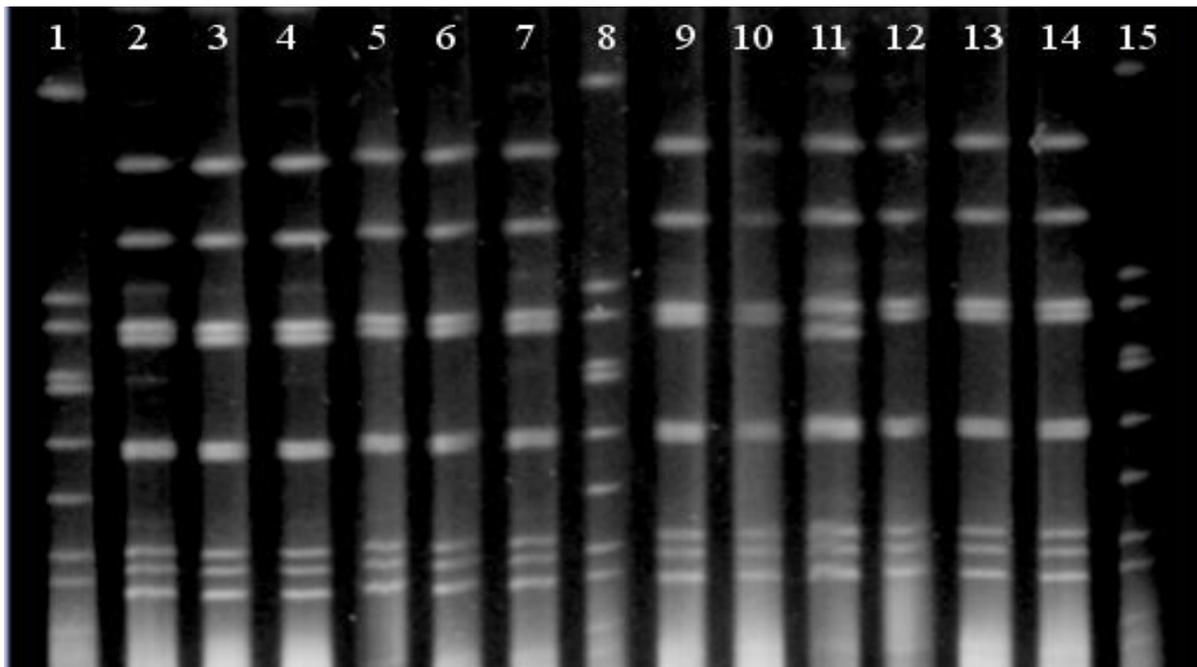


Abbildung 8: 1. Beispiel der Fragmentauftrennung mittels PFGE nach Makrorestriktion der chromosomalen DNA mit dem Restriktionsenzym *Cfr9I*: Darstellung der Restriktionsprofile von insgesamt 12 der 36 ausgewählten MRSA-Isolate aus Masthähnchenbestand 1 (M1).

Reihe 1, 8, 15 - NCTC 8325 (Molekulargewichtsstandard);

Reihe 2 - M1-HT6; **Reihe 3** - M1-HT16; **Reihe 4** - M1-HT26;

Reihe 5 - M1-HT36; **Reihe 6** - M1-HT46; **Reihe 7** - M1-CT1;

Reihe 9 - M1-CT11; **Reihe 10** - M1-CT21; **Reihe 11** - M1-CT31;

Reihe 12 - M1-CT41; **Reihe 13** - M1-SS; **Reihe 14** - M1-IPi1

HT= Hauttupfer, CT= Choanentupfer, SS= Sammelstaub, IPi= Impingement innen (Stallluft)

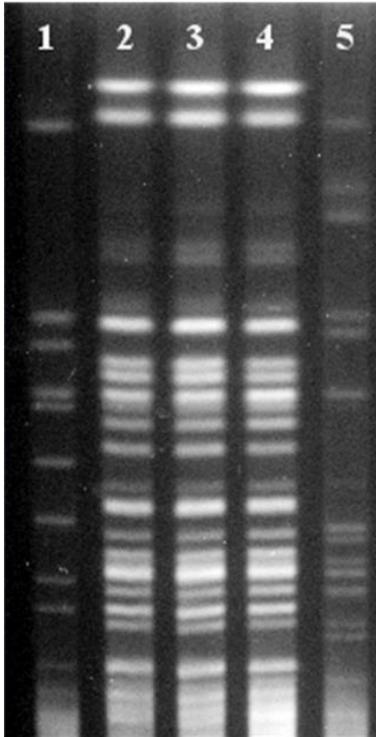


Abbildung 9: 2. Beispiel der Fragmentauftrennung mittels PFGE nach Makrorestriktion der chromosomalen DNA mit dem Restriktionsenzym *Cfr9I*: Darstellung der Restriktionsprofile von vier der insgesamt 30 ausgewählten MRSA-Isolate aus Putenbestand 1 (P1).

Reihe 1 - NCTC 8325 (Molekulargewichtsstandard);

Reihe 2 - P1-ST-Lee150-A; **Reihe 3** - P1-ST-Lee150-B;

Reihe 4 - P1-ST-Lee150-C; **Reihe 5** - P1-IPi1;

ST= Sockentupfer (hier 150 m Lee), IPi= Impingement innen (Stallluft),

A – C= mehrere Isolate derselben Probe

5.4.1 Genotypische Charakterisierung und Clusteranalyse

Die Ergebnisse der computergestützten Verwandtschaftsanalyse wurden in Form von Dendrogrammen dargestellt (siehe Abbildung 10 – 12), die zur Identifikation von genomischen Ähnlichkeiten bzw. Diversitäten zwischen einzelnen Isolaten herangezogen wurden. Bei einer Übereinstimmung von $\geq 85\%$ wurden MRSA-Stämme als genomisch ähnlich eingestuft (TENOVER et al., 1995; CARRICO et al., 2005) und in ein gemeinsames PFGE-Cluster, die in römischen Zahlen dargestellt wurden, zusammengefasst. Die unterschiedlichen PFGE-Muster sind in den Dendrogrammen 10 – 12 in alphabetischer Reihenfolge wiedergegeben, entsprechende PFGE-Subtypen wurden durch eine zusätzliche Nummerierung hinter den Buchstaben gekennzeichnet.

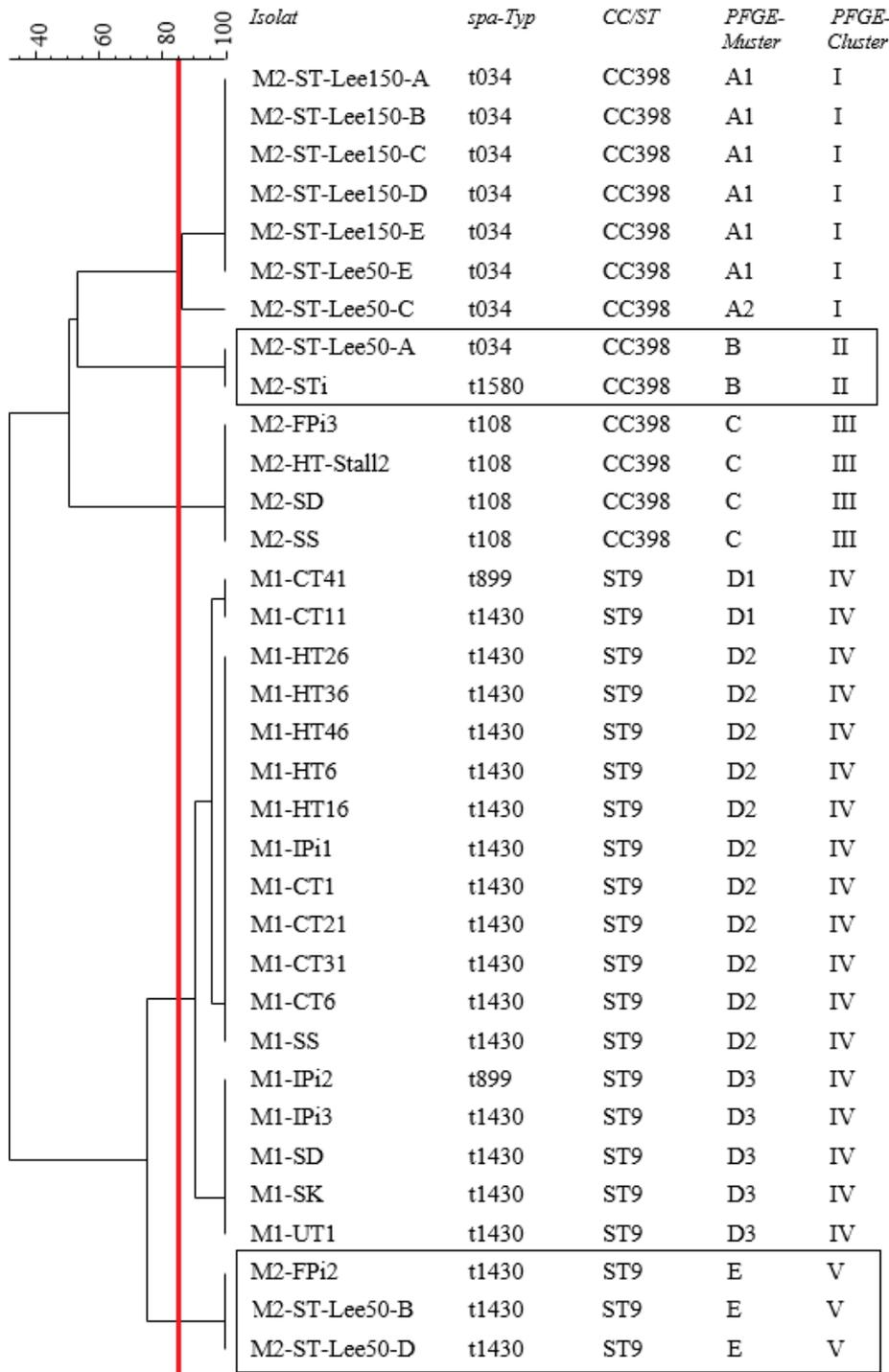


Abbildung 10: Dendrogramm der 34 MRSA-Isolate aus Masthähnchenbestand M1 und M2 basierend auf den Cfr9I-Makrorestriktionsmustern:

Die Verwandtschaftsanalyse wurde mit Dice-Einstellung für den Koeffizienten-Vergleich und der UPAGMA Methode durchgeführt. Bei einer Übereinstimmung von über 85 % wurden Isolate als genetisch verwandt eingestuft. Aus dem Tierstall bzw. der Stallumgebung stammende MRSA-Klone (100 % Übereinstimmung) wurden schwarz umrandet.

HT= Hauttupfer, CT= Choanentupfer, IPi= Impingement innen, FPi= Filtration innen, UT= Umgebungstupfer Stall, SD= Sedimentationsstaub, SS= Sammelstaub, ST Stall/ ST-Lee= Sockentupfer innen/außen; A-B= mehrere Isolate derselben Probe;

Auswertung der Verwandtschaftsanalyse - Masthähnchenbestände

Im Zuge der Auswertung ließen sich die 34 getesteten MRSA-Stämme aus Masthähnchenbestand 1 und 2 (M1, M2) acht verschiedenen Pulsfeldmustern (A1, A2, B, C, D1, D2, D3, E) zuordnen (siehe Abbildung 10).

Insgesamt wurden fünf PFGE-Cluster identifiziert. Während alle MRSA-Isolate aus Masthähnchenbestand M1 einem gemeinsamen PFGE-Cluster (IV) angehörten, wurden die übrigen Isolate aus M2 insgesamt vier verschiedenen Clustern (I, II, III, V) zugeordnet.

Die Isolate eines jeden PFGE-Clusters konnten dabei stets demselben *spa*-Typen zugeordnet werden, mit Ausnahme der beiden Isolate des PFGE-Musters B und D1 sowie den Isolaten des PFGE-Musters D3. Trotz identischer Makrorestriktionsmuster wurden diese verschiedenen *spa*-Typen, nämlich t034 und t1580 (PFGE-Muster B) bzw. t899 und t1430 (PFGE-Muster D1 und D2) zugeordnet. Wie bereits unter Punkt 5.1 beschrieben, stehen genannte *spa*-Typen in einem genetischen Zusammenhang.

Bei der speziellen Detektion von klonalen Verwandtschaften zwischen den aus dem Innen- und Außenbereich stammenden MRSA-Isolaten der Bestände wurden folgende Resultate erzielt: Eine hundertprozentige klonale Übereinstimmung der Makrorestriktionsmuster zeigten nur Isolate aus M2, die einerseits zwischen einer Bodenprobe von innen und außen (PFGE-Muster B) und andererseits zwischen einer Stallluft- und zwei Bodenproben von außen (PFGE-Muster E) vorlag. Zwischen den Isolaten aus M1, die allesamt aus dem Tierstall stammten (PFGE-Muster D1, D2, und D3), wurde eine 91-prozentige Übereinstimmung festgestellt.

Ähnlichkeiten zwischen mehreren Isolaten derselben Probe - Masthähnchenbestände

Von den Sockentupferproben, die aus dem Außenbereich der Tierbestände stammten, wurden zusätzlich mehrere Isolate, z.T. bis zu fünf verschiedene (A-E), aus einer Probe isoliert. Während zwischen den Isolaten M2-ST-Lee-150-A, -B, -C, -D und -E (PFGE-Muster A1) eine hundertprozentige Übereinstimmung nachgewiesen wurde, lag bei den Isolaten M2-ST-Lee-50-A, -B, -C, -D und -E, die insgesamt vier verschiedenen Pulsfeldmustern (A1, A2, B und E) angehörten, eine Diversität vor.

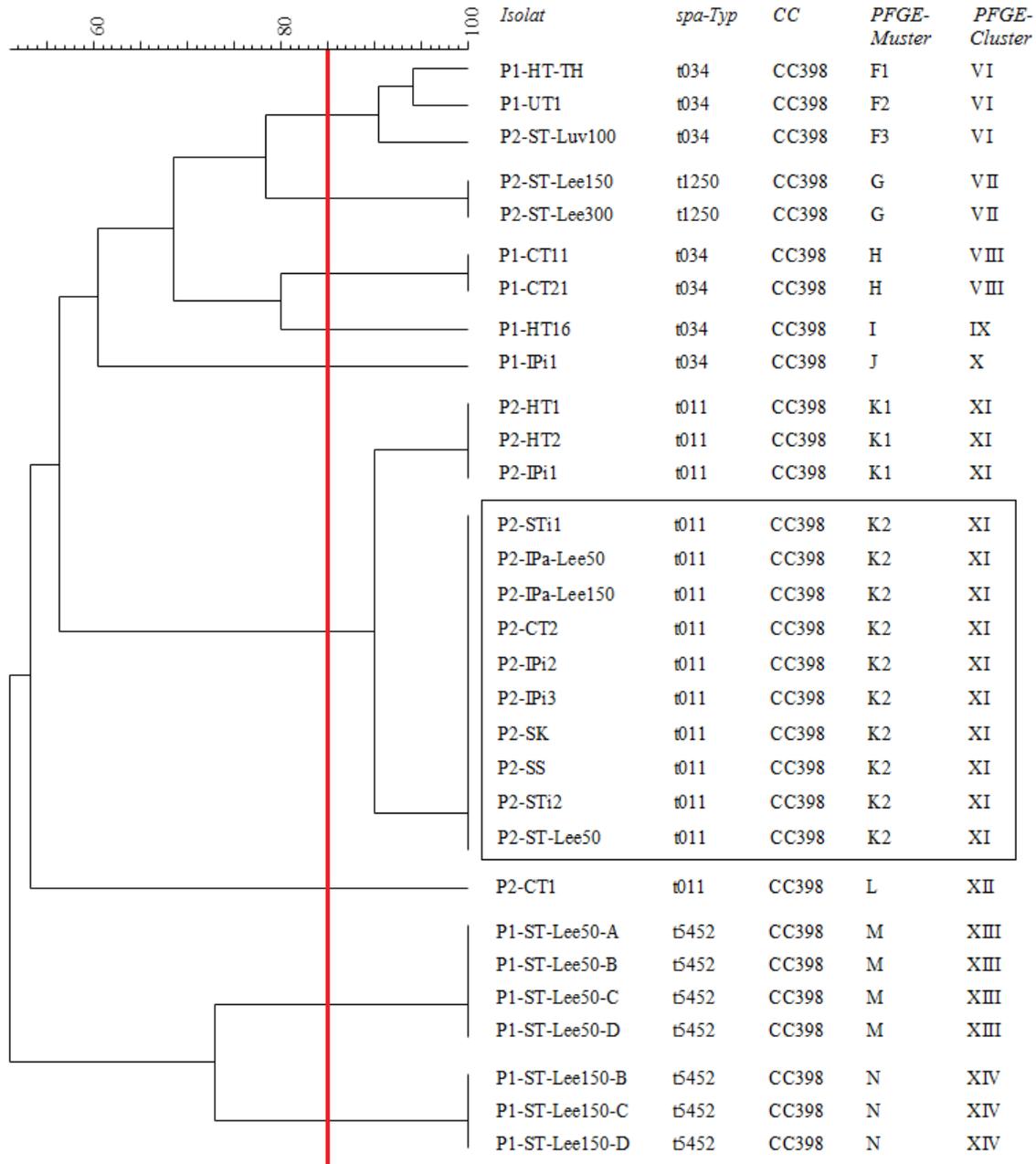


Abbildung 11: Dendrogramm der 30 MRSA-Isolate aus Putenmastbestand P1 und P2 basierend auf den Cfr9I-Makrorestriktionsmustern:

Die Verwandtschaftsanalyse wurde mit Dice-Einstellung für den Koeffizientenvergleich und der UPAGMA Methode durchgeführt. Bei einer Übereinstimmung von über 85 % wurden die typisierten Isolate als genetisch verwandt eingestuft. Aus dem Tierstall bzw. der Stallumgebung stammende MRSA-Klone (100% Übereinstimmung) wurden schwarz umrandet.

HT= Hauttupfer, CT= Choanentupfer, IPi/a= Impingement innen/außen, FPi= Filtration innen, UT= Umgebungstupfer Stall, SD= Sedimentationsstaub, SS= Sammelstaub, SK=Sammelkot, STi/ST-Lee= Sockentupfer innen/außen, TH=Tierhalter, A-B= kennzeichnet mehrere Isolate derselben Probe;

Auswertung der Verwandtschaftsanalyse - Putenmastbestände

Im Zuge der Auswertung wurden die 30 untersuchten MRSA-Isolate aus Putenmastbestand 1 und 2 (P1, P2) 12 verschiedenen Pulsfeldmustern (F1, F2, F3, G, H, I, J, K1, K2, L, M, N) sowie neun PFGE-Clustern (VI – XIV) zugeordnet (siehe Abbildung 11). Während bei Isolaten aus Putenmastbestand 1 sechs verschiedene PFGE-Cluster (VI, VIII, IX, X, XIII, XIV) vorkamen, waren es in Putenmastbestand 2 vier Cluster (VI, VII, XI, XII). Die Isolate eines jeden PFGE-Clusters konnten dabei stets demselben *spa*-Typen zugeordnet werden.

Bei der Detektion von klonalen Beziehungen zwischen MRSA-Isolaten, die aus dem Innen- und Außenbereich der Bestände stammten, wurden folgende Resultate erzielt: Nur in P2 (siehe PFGE-Muster K2) war es möglich, hundertprozentige klonale Übereinstimmungen zwischen Isolaten aus dem Tierstall (Sockentupfer-, Stallluft-, Sammelkot-, Sammelstaub- und eine Choanentupferprobe) und der Stallumgebung (Sockentupfer 50 m Lee, Außenluft 50 und 150 m Lee) nachzuweisen. In Putenmastbestand P2 ließ sich bei einer Bodenprobe, die von der Luv-Seite stammte (siehe PFGE-Muster F3), eine Ähnlichkeit von 90 % zu Isolaten aus dem Tierstall (Hauttupfer, Umgebung) von P1 nachweisen (siehe PFGE-Muster F2 und F3). Zwischen den übrigen Isolaten aus P2 (siehe PFGE-Muster K1 und K2) wurde eine Übereinstimmung von 90 % festgestellt. Die Pulsfeldmuster I, J und L traten nur einmalig auf.

Ähnlichkeiten zwischen mehreren Isolaten derselben Probe - Putenmastbestände

Die Isolate der Sockentupferproben P1-ST-Lee-50-A – E (siehe PFGE-Muster M) bzw. P1-ST-Lee-150-A – C (siehe PFGE-Muster N) zeigten beim Vergleich ihrer Makrorestriktionsmuster jeweils eine hundertprozentige Übereinstimmung.

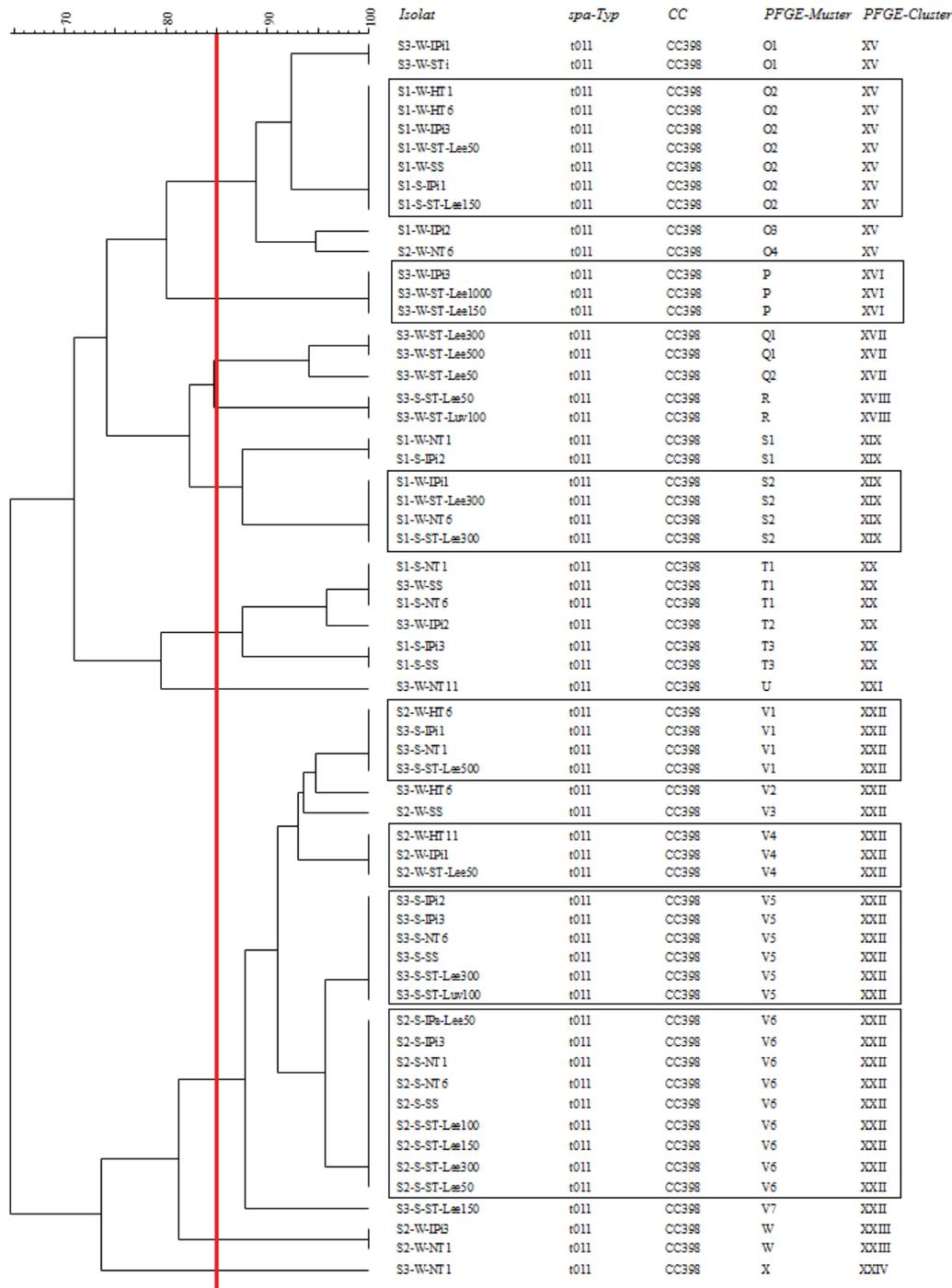


Abbildung 12: Dendrogramm der 60 MRSA-Isolate aus Schweinebeständen basierend auf den Cfr9I-Makrorestriktionsmustern:

Die Verwandtschaftsanalyse wurde mit Dice-Einstellung für den Koeffizienten-Vergleich und der UPAGMA Methode durchgeführt. Bei einer Übereinstimmung von über 85 % wurden die typisierten Isolate als genetisch verwandt eingestuft.

HT= Hauttupfer, NT= Nasentupfer, IPi/a= Impingement innen/außen, FPi= Filtration innen, SS= Sammelstaub, SK=Sammelkot, STi/ST-Lee= Sockentupfer innen/außen, S/W= Sommer, Winter, A-B= kennzeichnet mehrere Isolate derselben Probe; Aus dem Tierstall bzw. der Stallumgebung stammende MRSA-Klone (100% Übereinstimmung) wurden schwarz umrandet

Auswertung der Verwandtschaftsanalyse - Schweinebestände

In den Schweinebeständen S1, S2 und S3 wurden insgesamt 60 MRSA-Stämme bezüglich ihrer klonalen Verwandtschaft getestet, wobei die Auswahl auf solche Isolate fiel, die sowohl aus der Probenahme im Sommer sowie Winter stammten.

Im Zuge der Auswertung ließen sich 23 verschiedenen Pulsfeldmuster identifizieren, wobei es sich im Detail um O1 – O4, P, Q1 – Q2, R, S1 – S2, T1 – T3, U, V1 – V7, W und X handelte. Die MRSA-Isolate aus den untersuchten Schweinebeständen wurden in 10 verschiedene PFGE-Cluster (XV – XXIV) zusammengefasst, wobei Cluster XXII die Mehrzahl der Isolate angehörte (siehe Abbildung 12). Die MRSA-Isolate eines jeden PFGE-Clusters konnten dabei stets demselben *spa*-Typen zugeordnet werden.

Bezüglich des Nachweises von klonalen Beziehungen zwischen denen aus dem Innen- und Außenbereich stammenden MRSA-Isolaten wurden in den drei Beständen folgende Ergebnisse ermittelt: In S1 zeigten Isolate aus dem Tierstall (Hauttupfer, Nasentupfer, Stallluft, Sammelstaub) und der Stallumgebung (Sockentupfer 50 m, 150 m und 300 m Lee) eine hundertprozentige Übereinstimmung in der Clusteranalyse (siehe PFGE-Muster O2, S2). Dazu zählten auch Isolate, die aus der Probenahme im Sommer sowie Winter stammten. Im Detail handelte es sich um zwei Stallluftproben, nämlich S1-S-IPi1 und S1-W-IPi3 (siehe Pulsfeldmuster O2) bzw. um die beiden Sockentupferproben S1-S-ST-Lee300 und S1-W-ST-Lee300 (siehe Pulsfeldmuster S2). Darüber hinaus zeigten Nasentupferproben aus S1 eine Klonalität gegenüber einer Sammelstaubprobe aus S3 bzw. eine Stallluftprobe aus S1 eine Klonalität gegenüber einer Nasentupferprobe aus S2 (siehe PFGE-Muster T1, siehe PFGE-Cluster XV)

Auch in S2 und S3 wurden klonale Verwandtschaften zwischen MRSA-Isolaten von innen und außen festgestellt (siehe PFGE-Muster V4 – V6), die aber im Vergleich zu S1 entweder nur aus der Sommer- bzw. Winterprobenahme stammten. Im Detail zeigten aus dem Tierstall (Nasentupfer, Stallluft und Sammelstaub) bzw. aus dem Außenbereich von S2 stammende MRSA-Isolate, darunter auch eine Umgebungsluftprobe (Luft 50 m Lee) und Sockentupferproben (50 m, 100 m, 150 m und 300 m Lee), eine hundertprozentige Übereinstimmung in der Analyse (siehe PFGE-Muster V6).

Ebenso ließen sich auch zwischen Isolaten aus dem Stallinneren (Nasentupfer, Stallluft, Sammelstaub) bzw. der Umgebung von S3 (Sockentupfer 150 m Lee, 300 m Lee, 1000 m Lee, 100 m Luv) klonale PFGE-Muster nachweisen (siehe PFGE-Muster P und V5). Zusätzlich wurde zwischen Isolaten aus dem Tierstall und der Stallumgebung von S3 (Nasentupfer, Stallluft, Sockentupfer 500 m Lee) sowie einer Hauttupferprobe aus S2 (siehe Pulsfeldmuster V1) eine hundertprozentige Übereinstimmung festgestellt.

5.5 DNA-Microarray-Analyse

Die weiterführende Untersuchung mittels eines *Staphylococcus aureus* spezifischen DNA-Microarrays ermöglichte die Analyse von insgesamt 38 Microarray-Genprofilen.

Im Detail erfolgte die Detektion von virulenz- bzw. resistenzassoziierten Genen sowie spezies-spezifischen und regulatorischen Markergenen. Aber auch SCC*mec*-assoziierte Gene, Kapsel-Typ spezifische- und MSCRAMM-Gene ("microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules") wurden nachgewiesen.

Anhand der generierten Genexpressionsdaten erfolgte im Zuge der Auswertung eine erste Einschätzung bezüglich des pathogenen Potentials der 38 ausgewählten MRSA-Isolate. Darüber hinaus bot die Untersuchung eine weitere Möglichkeit, um Ähnlichkeiten bzw. Diversitäten zwischen den einzelnen Isolaten zu analysieren und mit den zuvor gewonnenen Typisierungsergebnissen zu vergleichen.

Während in Tabelle 17 die einzelnen 38 MRSA-Isolaten näher beschrieben werden, zeigt Tabelle 18 eine detaillierte Zusammenfassung der Genexpressionsdaten.

Tabelle 17: Probenschlüssel der in Tabelle 18 dargestellten MRSA-Isolate aus den untersuchten Masthähnchen-, Putenmast- und Schweinebeständen

Isolate	Probenschlüssel	CC/ST	Probenart
1	M1-HT6	ST9	Hauttupfer
2	M1-CT21	ST9	Choanentupfer
3	M1-CT31	ST9	Choanentupfer
4	M1-IPi2	ST9	Impingement innen (Stallluft)
5	M1-IPi3	ST9	Impingement innen
6	M2-ST-Stall2	CC398	Sockentupfer aus Stall 2
7	M2-ST-Lee50-2	ST9	Sockentupfer 50 m Lee
8	M2-ST-Lee150-1	CC398	Sockentupfer 150 m Lee
9	M2-FPi3	CC398	Filtration innen
10	M2-SS	CC398	Sammelstaub
11	P1-HT16	CC398	Hauttupfer
12	P1-IPi1	CC398	Impingement innen
13	P1-HT-TH	CC398	Hauttupfer Tierhalter
14	P1-ST-Lee150-3	CC398	Sockentupfer 150 m Lee
15	P2-CT1	CC398	Choanentupfer
16	P2-CT2	CC398	Choanentupfer
17	P2-ST-Lee300	CC398	Sockentupfer 300 m Lee
18	P2-IPa-Lee150	CC398	Sockentupfer 150 m Lee
19	P2-IPi3	CC398	Impingement innen
20	S1-W-HT1	CC398	Hauttupfer
21	S1-W-NT1	CC398	Nasentupfer
22	S1-W-IPi2	CC398	Impingement innen
23	S1-W-ST-Lee50	CC398	Sockentupfer 50 m Lee
24	S1-W-ST-Lee300	CC398	Sockentupfer 300 m Lee
25	S2-W-NT1	CC398	Nasentupfer
26	S2-W-IPi1	CC398	Impingement innen
27	S2-W-ST-Lee50	CC398	Sockentupfer 50 m Lee
28	S2-S-NT6	CC398	Nasentupfer
29	S2-S-IPi3	CC398	Impingement innen
30	S2-S-IPa-Lee50	CC398	Impingement außen 50 m Lee
31	S2-S-ST-Lee300	CC398	Sockentupfer 300 m Lee
32	S3-S-IPi2	CC398	Impingement innen
33	S3-S-NT6	CC398	Nasentupfer
34	S3-S-ST-Lee50	CC398	Sockentupfer 50 m Lee
35	S3-S-ST-Lee500	CC398	Sockentupfer 500 m Lee
36	S3-W-HT6	CC398	Hauttupfer
37	S3-W-NT11	CC398	Nasentupfer
38	S3-W-ST-Lee150	CC398	Sockentupfer 150 m Lee

CC= Clonal Complex; ST= Sequenztyp; M1/M2= Masthähnchenbestand 1/2;
P1/P2= Putenbestand 1/2; S1/S2/S3= Schweinebestand 1/2/3

Antibiotikaresistenz-Gene

Bei allen untersuchten MRSA-Stämmen trat das Methicillin-Resistenzgen *mecA* sowie das Penicillin-Resistenz vermittelnde β -Lactamase-Gen *blaZ* auf. Darüber hinaus ließen sich weitere Antibiotikaresistenzgene regelmäßig detektieren. Zusammenfassend wurden *mecA* sowie *blaZ* bei den 38 untersuchten MRSA-Isolaten am häufigsten nachgewiesen (100 %), gefolgt von Makrolid-Lincosamid-Streptogramin- (76 %) und Tetrazyklin-Resistenzdeterminanten (63 %). Während bei 26 % der Isolate das Fosfomycin-Resistenzgen vorkam, besaßen 24 % Aminoglykosid-Resistenzgene. Vereinzelt ließen sich das Trimethoprim- (8 %) bzw. Streptothricin-Resistenzgen (3%) nachweisen. Die detektierten Antibiotikaresistenz-Gene zeigten insgesamt eine homogene Verteilung zwischen den Isolaten aus dem Innen- und Außenbereich der Tierbestände. Nur die Streptothricin und Trimethoprim resistenten MRSA-Stämmen kamen ausschließlich in der Umgebung vor.

Im Detail wurden mittels Microarray-Analyse folgende Ergebnisse erzielt: Bei neun Isolaten aus Masthähnchenbestand M1 und M2 (1, 3 – 10), sechs Isolaten aus Putenmastbestand P1 und P2 (11 – 14 und 16, 17) sowie 14 Isolaten aus den Schweinebeständen S1, S2 und S3 (20 – 23, 25 – 28 und 33 – 38) traten Makrolid/Lincosamid/Streptogramin-Resistenzgene (*ermA*, *ermB*, *ermC*) auf, wobei die Isolate 16 und 36 für die Antibiotikaresistenzgene *vgaA* und *linA* ein zweideutiges Ergebnis lieferten. Die Tetrazyklin-Resistenzdeterminanten *tetM*, *tetK* und *tetEfflux* wurden bei zehn Isolaten aus M1 und M2 (1 – 10), drei Isolaten aus P1 und P2 (14, 16, 17) sowie elf Isolaten aus S1, S2 und S3 (20 – 22, 25 – 26, 30, 32 – 33, 35, 37 – 38) nachgewiesen, wobei die Isolate 6 und 25 (*tetM*) sowie 26, 37 und 38 (*tetK*) und 33 (*tetEfflux*) in der Microarray-Analyse kein eindeutiges Ergebnis zeigten.

Während sechs Isolate aus M1 und M2 (1, 3, 5 – 8) sowie ein Isolat aus P1 (14) bzw. S2 (25) Aminoglykosid-Resistenzgene (*aacA* - *aph-D*, *aadD*, *aphA*) besaßen, wiesen fünf Isolate aus M1 und M2 (1 – 3, 5, 8), ein Isolat aus P2 (15) sowie drei Isolaten aus S1 und S2 (23, 28 und 31) das Fosfomycin-Resistenzgen *fosB* auf.

Darüber hinaus war bei einem aus P1 stammenden Isolat das *sat*-Gen (Streptothricin-Resistenz) bzw. bei drei Isolaten aus S1 und S2 die Trimethoprim-Resistenzdeterminante *dfrA* detektierbar.

Virulenzfaktoren

Des Weiteren wurden virulenzassoziierte Gene detektiert, darunter solche, die für Enterotoxine, Leukozidine, Hämolysine und Proteasen kodieren. Während das Enterotoxin Gen-Cluster (*egc: seg, sei, sem, sen, (seo)* und *seu*) bei fünf Isolaten aus Masthähnchenbestand M1 und M2 (1, 2, 3, 5, 7) des Sequenztyps ST9 identifiziert wurde, kamen die Enterotoxin-Gene *entG*, *entJ* und *entQ* vereinzelt bei insgesamt sechs Isolaten aus den Schweinebeständen S1, S2 und S3 (20, 22, 23, 24, 31, 36) vor. Bei keinem der untersuchten MRSA-Isolate trat das PVL-Gen (Panton-Valentine-Leukozidin) auf.

Allerdings wurden andere Leukozidin-kodierenden Gene wie *lukF* und *lukS* bei allen Isolaten (mit Ausnahme der Geflügelisolate 4 und 19) detektiert, aber auch *hlgA*, *lukX* und *lukY-var1* kamen vor (siehe Tabelle 18).

Unter den Hämolysin-kodierenden Genen wurden bei nahezu allen Isolaten *hl* und *hlII* (mit Ausnahme des Putenmastisolats 13) detektiert, gefolgt von *un-truncated hlb* sowie *hld* aber auch *hla* und *hlc*. Die Protease-Gene *aur*, *sspA*, *sspB* und *sspP* waren bei nahezu allen MRSA-Isolaten nachweisbar.

Adhäsionsfaktoren

Alle ausgewählten MRSA-Stämme wurden im Zuge der Auswertung dem Kapsel-Typ 5 (*capsule-5, capH5, capJ5, capK5*) zugeordnet. Weiterhin waren die Biofilm-assoziierten Gene *icaA*, *icaC* und *icaD* regelmäßig bei den 38 Isolaten nachweisbar (siehe Tabelle 18). Zu den identifizierten MSCRAMM-Genen gehörten *bbp*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *ebh*, *eno*, *fib*, *ebpS*, *fnbA*, *fnbB*, *map*, *sdrC*, *sdrD* und *vwb*.

Regulatorische und Spezies-spezifische Markergene sowie SCCmec-assoziierte Gene

Die für *Staphylococcus aureus* typischen Marker und regulatorischen Gene (23s-rRNA, *gapA*, *katA*, *coA*, *spa*, *sbi*, *nuc*, *fnbA*, *vraS*, *sarA*, *eno*, *saeS*) waren, mit Ausnahme des *fnbA* Gens, bei allen Isolaten detektierbar. Des Weiteren wurden SCCmec Typ IV assoziierte Gene (*mecA*, *mecR_truncated*, *ugpQ*, *ccrA2*, *ccrB-2*) bei den Isolaten 1, 2, 3, 4, 5 und 7 aus M1 und M2 nachgewiesen bzw. bei allen übrigen Isolaten SCCmec Typ IV assoziierte Gene (*ccr-AA-MRSAZH74*, *ccr-C*).

5.6 Proteinprofilcharakterisierung mittels MALDI-TOF-MS

Für die Untersuchung mittels Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) wurden 34 Isolate exemplarisch ausgewählt. Im Detail handelte es sich dabei um MRSA-Stämme, die aus den Masthähnchenbeständen M1 und M2 (siehe Tabelle 19) stammten und bereits im Vorfeld mittels Pulsfeldgelelektrophorese nach Makrorestriktion der chromosomalen DNA molekularbiologisch typisiert wurden. Von allen Bakterienproben ließen sich mit Hilfe der MALDI-TOF-MS Messung charakteristische Massenspektren generieren. Diese wurden wie auch nach der PFGE-Analyse einer computergestützten Verwandtschaftsanalyse unterzogen, die unter Punkt 5.6.2 ausführlich beschrieben wird. In einer abschließenden Auswertung wurden zusätzlich die generierten Dendrogramme aus den parallel durchgeführten Clusteranalysen (Makrorestriktionsanalyse, MALDI-TOF-MS) miteinander verglichen, um mögliche Ähnlichkeiten bzw. Diversitäten zu identifizieren. Im Zuge dieser Gegenüberstellung sollte untersucht werden, ob beide Methoden übereinstimmende Ergebnisse erzielen würden und zur MRSA-Feintypisierung für epidemiologische Fragestellungen zukünftig auch die MALDI-TOF-MS empfohlen werden könnte.

5.6.1 Composite Correlation Index

Um die Reproduzierbarkeit der generierten Proteinspektren zu ermitteln, wurde der Composite Correlation Index (CCI), ein statistisches Tool der MALDI Biotyper Software verwendet und für die obengenannten Isolate berechnet. Während CCI-Werte von 1 auf hohe Übereinstimmungen zwischen den Spektren hindeuteten, wiesen CCI-Werte von 0 auf deutliche Unterschiede hin (siehe Abbildung 13). Zur besseren Visualisierung wurde der Grad der Korrelation in Abbildung 14 zusätzlich in Farbe dargestellt, wonach Rot eine enge Beziehung zwischen den Spektren widerspiegelte, hingegen Grün deutliche Unterschiede.

Tabelle 19: Probenschlüssel der in Abbildung 13 – 17 dargestellten MRSA-Isolate aus Masthähnchenbestand M1 und M2

Isolat	Probenschlüssel	Probenart	Nomenklatur MALDI-TOF-MS Analyse*	Nomenklatur PFGE-Analyse
1	M1-HT16	Hauttupfer	1_1,2,3,4,5,6	1
2	M1-HT26	Hauttupfer	2_1,2,3,4,5,6	2
3	M1-HT36	Hauttupfer	3_1.2.3.4.5.6	3
4	M1-HT46	Hauttupfer	4_1,2,3,4,5,6	4
5	M1-HT6	Hauttupfer	5_1,2,3,4,5,6	5
6	M1-IPi1	Impingement innen	6_1,2,3,4,5,6	6
7	M1-IPi2	Impingement innen	7_1,2,3,4,5,6	7
8	M1-IPi3	Impingement innen	8_1,2,3,4,5,6	8
9	M1-CT1	Choanentupfer	9_1,2,3,4,5,6	9
10	M1-CT11	Choanentupfer	10_1,2,3,4,5,6	10
11	M1-CT21	Choanentupfer	11_1,2,3,4,5,6	11
12	M1-CT31	Choanentupfer	12_1,2,3,4,5,6	12
13	M1-CT41	Choanentupfer	13_1,2,3,4,5,6	13
14	M1-CT6	Choanentupfer	14_1,2,3,4,5,6	14
15	M1-SD	Sedimentationsstaub	15_1,2,3,4,5,6	15
16	M1-SK	Sammelkot	16_1,2,3,4,5,6	16
17	M1-SS	Sammelstaub	17_1,2,3,4,5,6	17
18	M1-UT1	Umgebungstupfer	18_1,2,3,4,5,6	18
19	M2-FPi2	Filtration innen	19_1,2,3,4,5,6	19
20	M2-FPi3	Filtration innen	20_1,2,3,4,5,6	20
21	M2-HT-Stall2	Hauttupfer	21_1,2,3,4,5,6	21
22	M2-SD	Sedimentationsstaub	22_1,2,3,4,5,6	22
23	M2-SS	Sammelstaub	23_1,2,3,4,5,6	23
24	M2-ST-Lee150-A	Sockentupfer 150 m Lee	24_1,2,3,4,5,6	24
25	M2-ST-Lee150-B	Sockentupfer 150 m Lee	25_1,2,3,4,5,6	25
26	M2-ST-Lee150-C	Sockentupfer 150 m Lee	26_1,2,3,4,5,6	26
27	M2-ST-Lee150-D	Sockentupfer 150 m Lee	27_1,2,3,4,5,6	27
28	M2-ST-Lee150-E	Sockentupfer 150 m Lee	28_1,2,3,4,5,6	28
29	M2-ST-Lee50-A	Sockentupfer 50 m Lee	29_1,2,3,4,5,6	29
30	M2-ST-Lee50-B	Sockentupfer 50 m Lee	30_1,2,3,4,5,6	30
31	M2-ST-Lee50-C	Sockentupfer 50 m Lee	31_1,2,3,4,5,6	31
32	M2-ST-Lee50-D	Sockentupfer 50 m Lee	32_1,2,3,4,5,6	32
33	M2-ST-Lee50-E	Sockentupfer 50 m Lee	33_1,2,3,4,5,6	33
34	M2-STi	Sockentupfer innen	34_1,2,3,4,5,6	34

M1/M2= Masthähnchenbestand 1/2; Isolate aus M1 sind in blau bzw. Isolate aus M2 in rot dargestellt, * von jedem Isolat wurden zufällig sechs der 27 generierten Massenspektren für die Clusteranalyse ausgewählt, die Zahlen 1 – 34 stehen für die jeweiligen Isolate, die dahinterstehenden Zahlen 1 – 6 für die sechs ausgewählten Spektren

	Isolate																																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
M-1-HT16	1	0,97	0,94	0,94	0,96	0,95	0,88	0,72	0,72	0,95	0,89	0,94	0,90	0,92	0,69	0,87	0,90	0,87	0,71	0,85	0,62	0,72	0,78	0,76	0,65	0,65	0,68	0,69	0,66	0,51	0,56	0,58	0,71	0,58	0,73	
M-1-HT26	2		0,93	0,93	0,94	0,93	0,88	0,71	0,71	0,94	0,88	0,91	0,88	0,91	0,67	0,86	0,88	0,88	0,71	0,83	0,61	0,70	0,77	0,75	0,64	0,64	0,67	0,69	0,65	0,52	0,58	0,59	0,71	0,59	0,74	
M-1-HT36	3			0,96	0,96	0,93	0,90	0,71	0,72	0,94	0,90	0,91	0,88	0,93	0,65	0,84	0,87	0,89	0,70	0,85	0,64	0,72	0,80	0,78	0,68	0,67	0,70	0,71	0,68	0,56	0,60	0,63	0,72	0,62	0,77	
M-1-HT46	4				0,97	0,94	0,89	0,70	0,72	0,96	0,89	0,92	0,88	0,92	0,66	0,85	0,88	0,88	0,70	0,85	0,63	0,72	0,80	0,77	0,67	0,66	0,69	0,71	0,68	0,54	0,58	0,61	0,72	0,61	0,76	
M-1-HT6	5					0,96	0,88	0,72	0,72	0,92	0,89	0,91	0,90	0,91	0,69	0,89	0,90	0,88	0,71	0,81	0,58	0,69	0,73	0,71	0,61	0,61	0,66	0,67	0,62	0,51	0,58	0,57	0,70	0,56	0,74	
M-1-IP1	6						0,91	0,71	0,69	0,89	0,89	0,88	0,88	0,92	0,62	0,83	0,83	0,90	0,68	0,86	0,64	0,69	0,81	0,79	0,68	0,67	0,68	0,68	0,55	0,65	0,63	0,75	0,63	0,78		
M-1-IP2	7							0,93	0,02	0,70	0,71	0,72	0,75	0,73	0,79	0,72	0,68	0,73	0,03	0,68	0,02	0,74	0,61	0,60	0,05	0,66	0,64	0,21	0,03	0,02	0,80	0,54	0,85	0,59	0,61	
M-1-IP3	8								0,91	0,70	0,69	0,70	0,70	0,71	0,02	0,68	0,68	0,70	0,03	0,64	0,71	0,02	0,59	0,57	0,72	0,67	0,77	0,81	0,70	0,65	0,02	0,59	0,03	0,65	0,59	
M-1-CT1	9									0,98	0,89	0,93	0,88	0,91	0,67	0,84	0,87	0,87	0,70	0,87	0,65	0,73	0,83	0,80	0,69	0,68	0,70	0,71	0,70	0,53	0,57	0,61	0,72	0,62	0,75	
M-1-CT11	10										0,89	0,88	0,88	0,91	0,62	0,84	0,84	0,89	0,68	0,84	0,62	0,69	0,78	0,76	0,66	0,65	0,67	0,67	0,66	0,55	0,64	0,62	0,73	0,61	0,77	
M-1-CT21	11											0,99	0,90	0,91	0,67	0,86	0,87	0,88	0,70	0,88	0,64	0,71	0,81	0,79	0,67	0,67	0,67	0,67	0,68	0,51	0,59	0,59	0,73	0,60	0,74	
M-1-CT31	12												0,93	0,90	0,65	0,89	0,85	0,90	0,69	0,86	0,60	0,67	0,76	0,75	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,52	0,64	0,60	0,74	0,60	0,75	
M-1-CT41	13													0,94	0,64	0,86	0,85	0,92	0,69	0,87	0,64	0,71	0,81	0,79	0,69	0,68	0,69	0,70	0,68	0,57	0,65	0,64	0,76	0,64	0,79	
M-1-CT6	14														0,88	0,69	0,70	0,62	0,63	0,59	0,02	0,67	0,53	0,51	0,03	0,54	0,56	0,15	0,02	0,01	0,58	0,42	0,67	0,45	0,50	
M-1-SD	15															0,93	0,88	0,86	0,70	0,78	0,54	0,63	0,67	0,66	0,56	0,57	0,61	0,61	0,57	0,48	0,61	0,55	0,69	0,54	0,71	
M-1-SK	16																0,92	0,83	0,73	0,79	0,56	0,66	0,71	0,68	0,58	0,59	0,62	0,63	0,59	0,45	0,55	0,53	0,67	0,53	0,69	
M1-SS	17																	0,92	0,68	0,85	0,61	0,67	0,77	0,76	0,66	0,65	0,67	0,66	0,65	0,56	0,67	0,64	0,75	0,63	0,79	
M-1-UT1	18																		0,94	0,65	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,56
M-2-FP2	19																			0,94	0,69	0,68	0,88	0,88	0,70	0,70	0,64	0,63	0,73	0,51	0,63	0,60	0,75	0,63	0,73	
M-2-FP3	20																				0,93	0,02	0,72	0,72	0,89	0,83	0,79	0,78	0,91	0,72	0,02	0,70	0,03	0,79	0,63	
M-2-HT-Stall2	21																					0,94	0,67	0,65	0,08	0,80	0,74	0,29	0,05	0,02	0,02	0,65	0,02	0,54	0,66	
M-2-SD	22																						0,92	0,92	0,74	0,73	0,66	0,65	0,75	0,56	0,55	0,66	0,69	0,68	0,78	
M-2-SS	23																							0,93	0,74	0,72	0,65	0,63	0,75	0,57	0,56	0,67	0,68	0,69	0,78	
M-2-ST-Lec150-A	24																								0,94	0,84	0,82	0,82	0,91	0,77	0,02	0,80	0,03	0,84	0,68	
M-2-ST-Lec150-B	25																									0,86	0,78	0,75	0,84	0,71	0,57	0,73	0,62	0,78	0,67	
M-2-ST-Lec150-C	26																										0,86	0,86	0,78	0,78	0,54	0,75	0,59	0,79	0,70	
M-2-ST-Lec150-D	27																											0,89	0,78	0,78	0,02	0,74	0,49	0,78	0,69	
M-2-ST-Lec150-E	28																												0,95	0,71	0,02	0,73	0,03	0,80	0,64	
M-2-ST-Lec50-A	29																													0,88	0,02	0,75	0,02	0,78	0,66	
M-2-ST-Lec50-B	30																														0,88	0,51	0,85	0,63	0,59	
M-2-ST-Lec50-C	31																															0,86	0,52	0,81	0,74	
M-2-ST-Lec50-D	32																																0,95	0,66	0,65	
M-2-ST-Lec50-E	33																																		0,85	0,71
M-2-STi	34																																			0,92

Abbildung 13: CCI-Werte ausgewählter MRSA-Isolate als Rohdatensatz :
 Ein CCI-Wert von 1 weist auf eine hohe Übereinstimmung zwischen den Spektren hin, Werte von 0 hingegen auf deutliche Unterschiede.

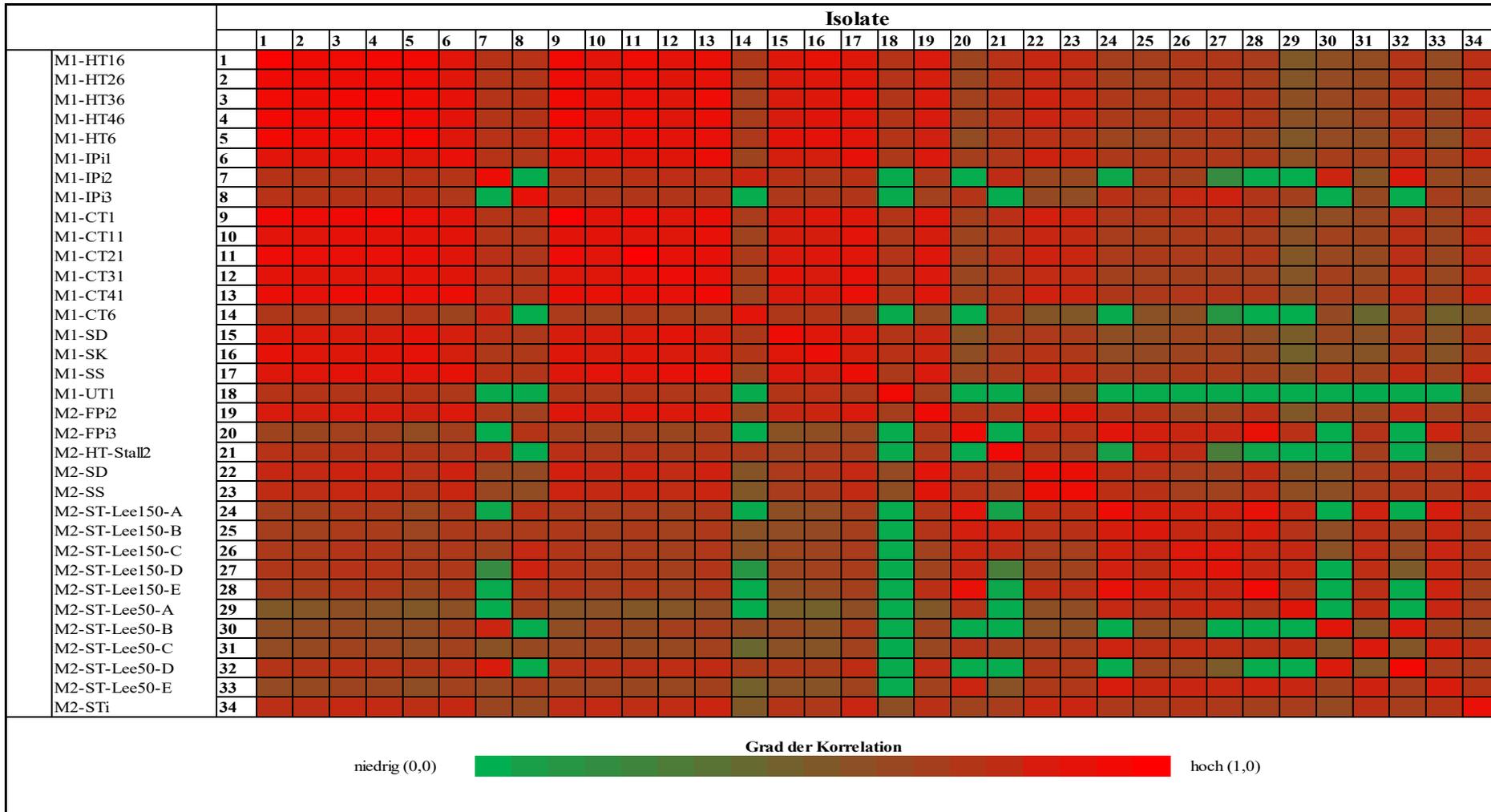


Abbildung 14: Farbliche Darstellung des Composite Correlation Index der 34 Massenspektren ausgewählter MRSA-Isolate: Evaluierung der Unverwechselbarkeit zwischen den ermittelten Massenspektren. Die Berechnung des CCI erfolgte mittels MALDI Biotyper 3.0 Software in einem Massenbereich von 3000-12000 Da und einer Auflösung von 4,4 Intervallen ohne Auto-Korrektion.

Auswertung der Reproduzierbarkeit generierter Proteinspektren anhand ermittelter CCI-Werte

Zur Beurteilung von Spektrenvariationen innerhalb und zwischen den einzelnen MALDI-Messreihen, wurde für 34 ausgewählte MRSA-Stämme der CCI berechnet. Im Zuge der Auswertung der 27 generierten Spektren eines jeden Isolates ließen sich dabei Werte zwischen 0,85 – 0,99 ermitteln (siehe fett gedruckte Zahlen in Abbildung 13).

Des Weiteren konnten insgesamt drei verschiedene Gruppen in Masthähnchenbestand M1 dektektiert werden, denen die Isolate 1 – 6, 9 – 13 sowie 15 – 17 angehörten (siehe Abbildung 14). Im Detail stammten diese ausschließlich aus dem Tierstall des Masthähnchenbestandes (Haut- und Choanentupfer, Stallluft, Stallstaub, Sammelkot) und erzielten in der Berechnung CCI-Werte von 0,87 – 0,97. Ob zwischen den genannten Isolaten tatsächlich eine Ähnlichkeit besteht, wird in der nachfolgenden Clusteranalyse weiterführend untersucht werden.

5.6.2 Clusteranalyse zum Vergleich von Bakterienisolaten auf Proteinebene

Für die Durchführung der Verwandtschaftsanalyse wurden von jedem MRSA-Isolat (n=34) zunächst sechs der 27 mittels MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren zufällig ausgewählt (siehe Punkt 4.2.7). In der Summe konnte somit die Beurteilung von insgesamt 204 Proteinspektren mittels PAST-Software erfolgen (siehe Abbildung 15).

Für die Auswertung der Clusteranalyse wurde ein vorläufiger orientierender Grenzwert von 0,74 festgesetzt (siehe Punkt 4.2.7).

Auswertung der Reproduzierbarkeit der generierten MALDI-Spektren mittels PAST-Software

Generierte Proteinprofile wurden als ähnlich anerkannt, wenn alle sechs Spektren eines Isolates auch ein gemeinsames Cluster ausbildeten und darüber hinaus eine Übereinstimmung von über 0,74 zeigten (Punkt 4.2.7). Von den 34 ausgewählten MRSA-Isolaten, die aus den Masthähnchenbeständen M1 (blau hervorgehoben in Abbildung 15) und M2 (rot hervorgehoben in Abbildung 15) stammten, erfüllten insgesamt sechs Isolate diese Parameter. Die vier MRSA-Isolate 5, 11, 16 und 17 stammten aus dem Masthähnchenbestand M1 und sind den MALDI-Clustern A10, A5, A11 und A6 zugeordnet. Die beiden Isolate 27 und 32 aus dem Masthähnchenbestand M2 gehörten den MALDI-Clustern A3 und A14 an (jeweils durch schwarze Umrandung in Abbildung 15 hervorgehoben). Alle übrigen Isolate (n=28) erfüllten diese Kriterien nicht.

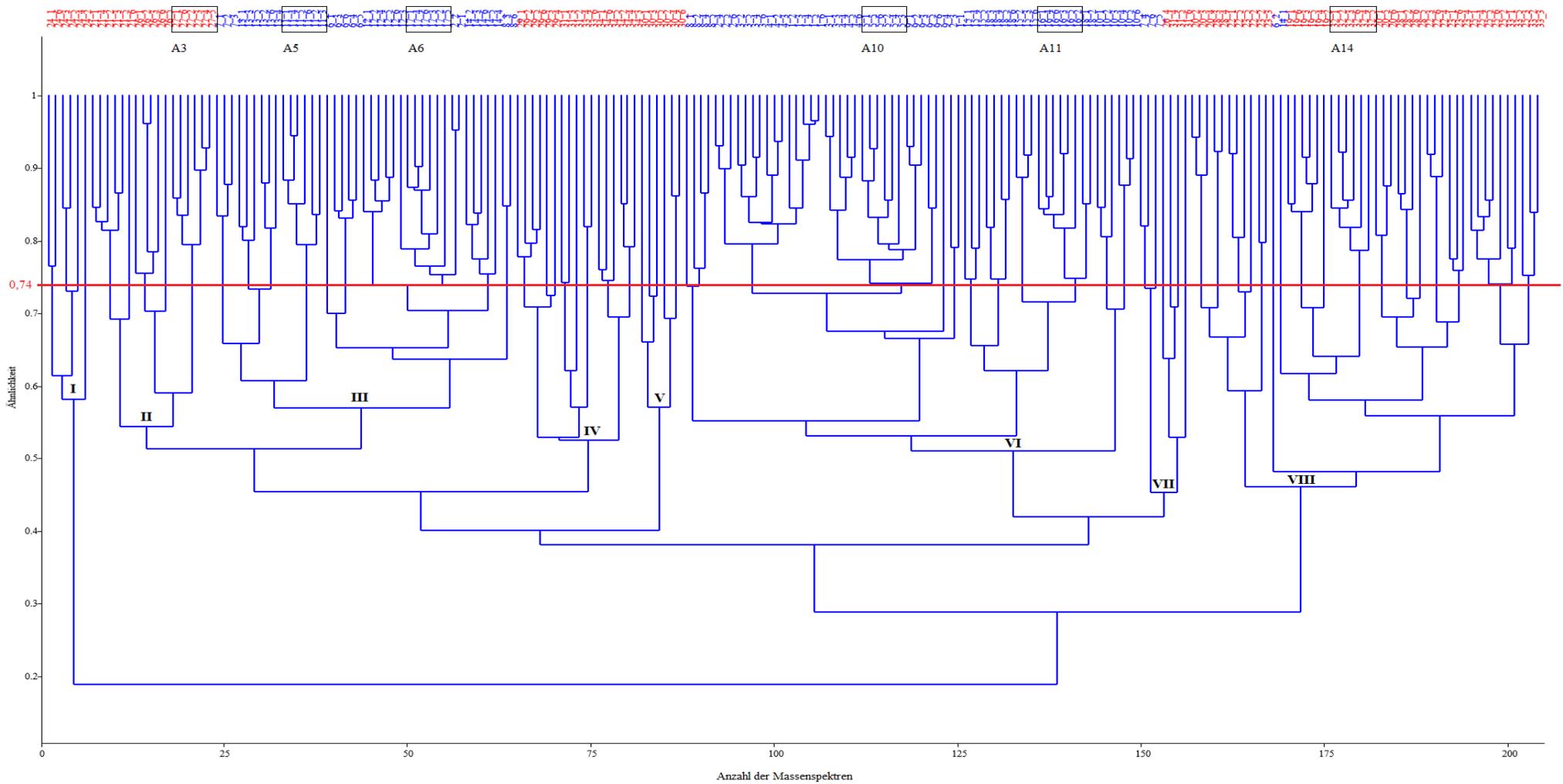


Abbildung 15: Clusteranalyse der MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren mittels PAST-Software (n=204): Bei einer Übereinstimmung von über 0,74 wurde Isolate, deren 6 Massenspektren in einem gemeinsamen Cluster vorlagen, auch als ähnlich eingestuft (schwarz umrandet). Isolate aus M1 sind in blau bzw. Isolate aus M2 in rot dargestellt. Die MALDI-Cluster sind mit den römischen Ziffern I-VIII gekennzeichnet. Auf der x-Achse wird die Ähnlichkeit bzw. auf der y-Achse die Anzahl der generierten Massenspektren dargestellt

Auswertung der Clusteranalyse mittels PAST-Software

Wie bereits unter Punkt 5.6.1 beschrieben, konnten durch die Berechnung des Composite Correlation Index für die Isolate 1 – 6, 9 – 13 sowie 15 – 17, die aus Masthänchenbestand M1 stammten, CCI-Werte von 0,87 – 0,97 ermittelt werden. Dies ermöglichte, wie in Abbildung 14 dargestellt, die Zuordnung der Isolate zu drei verschiedenen Gruppen.

Um einen direkten Vergleich zwischen den beiden Analysen zu ermöglichen, wurde bei der Auswertung des Dendrogramms der zuvor ermittelte orientierende Grenzwert von 0,74 außer Acht gelassen und stattdessen eine Beurteilung unter Zuhilfenahme anderer, niedrigerer Grenzwerte vorgenommen. Im Ergebnis ließen sich insgesamt acht MALDI-Cluster (I – VIII) unterscheiden, wobei die Isolate 1 – 6 drei verschiedenen MALDI-Clustern (III, VI, VIII) bzw. die Isolate 9 – 13 und 15 – 17 jeweils zwei verschiedenen MALDI-Clustern (III und VI) angehörten (siehe Abbildung 15).

Bedingt durch die aufwendige Präparations- und Messtechnik, spiegelt das generierte Dendrogramm aus Abbildung 15 vor allem die hohe Auflösungskraft der MALDI-TOF-MS Analyse wider. Da eine Aussage bezüglich epidemiologischer Zusammenhänge auf diese Weise jedoch nicht getroffen werden konnte, erfolgte vor der eigentlichen Gegenüberstellung der parallel durchgeführten Clusteranalysen eine weiterführende Auswertung des Dendrogramms aus Abbildung 15. Mit dem Ziel eine bessere Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden zusätzlich zum vorläufig festgesetzten Grenzwert von 0,74, drei weitere Grenzwerte (0,5; 0,55; 0,6) getestet und eine detaillierte Überprüfung der einzelnen MALDI-Cluster vorgenommen. Im Ergebnis ließen sich bei einem Grenzwert von 0,5 insgesamt zehn MALDI-Cluster, bei einem Grenzwert von 0,55 insgesamt 17 MALDI-Cluster und bei einem Grenzwert von 0,6 insgesamt 26 MALDI-Cluster unterscheiden (siehe Anlage 3 und 4, Anhang).

Schließlich wurde für den bevorstehenden Vergleich entschieden, von jedem MRSA-Isolat (n=34) immer nur das jeweils erste der sechs MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren auszuwählen und die Beurteilung mittels PAST-Software zu wiederholen (siehe Abbildung 16). Darüber hinaus wurden keine Grenzwerte zur Auswertung des Dendrogramms herangezogen, sondern eine Beurteilung nach optischen Gesichtspunkten vorgenommen.

5.6.3 Gegenüberstellung der generierten Dendrogramme aus der Makrorestriktionsanalyse bzw. MALDI-TOF-MS Analyse

Ziel dieser abschließenden Gegenüberstellung war es, die generierten Dendrogramme aus der Makrorestriktionsanalyse bzw. MALDI-TOF-MS Analyse miteinander zu vergleichen. Im Vorfeld wurden dazu identische Analyseparameter geschaffen, wie beispielsweise die Auswahl derselben Isolate (siehe Tabelle 19) sowie die Durchführung beider Verwandtschaftsanalysen mit dem gleichen Algorithmus (UPGMA) sowie dem Dice-Koeffizienten.

Da die computergestützte Verwandtschaftsanalyse der mittels PFGE generierten Restriktionsprofile bereits unter Punkt 5.4.1 abgehandelt wurde, erfolgt hier nur die Darstellung des Dendrogramms für die 34 ausgewählten MRSA-Isolate aus Masthähnchenbestand M1 und M2 (siehe Abbildung 17).

Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den beiden Clusteranalysen wurden für die ausgewählten Isolate die gleiche Nomenklatur bzw. farbliche Markierung verwendet (siehe Tabelle 19).

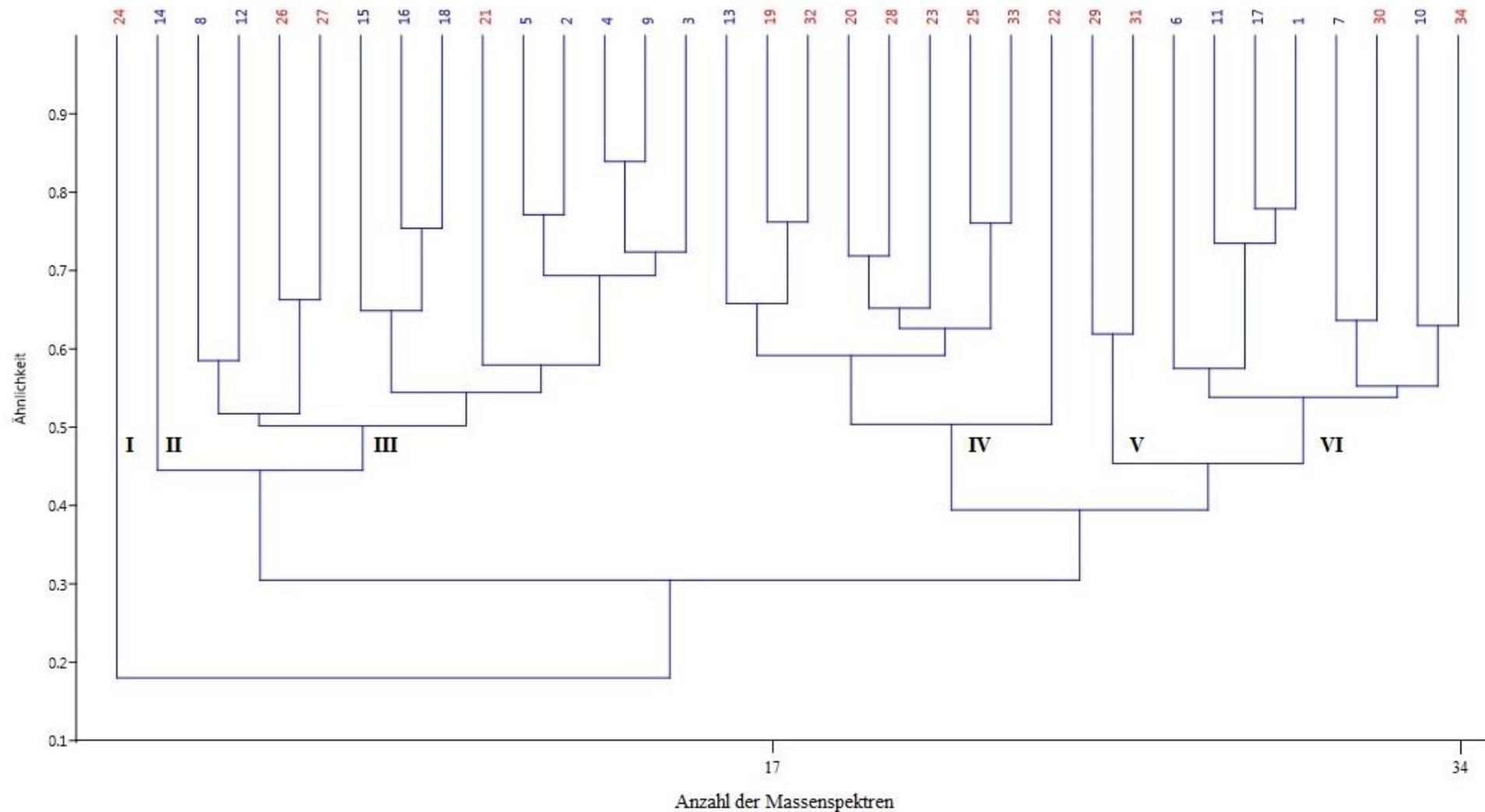


Abbildung 16: Clusteranalyse der MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren mittels PAST-Software (n=34): Isolate aus M1 sind in blau bzw. Isolate aus M2 in rot dargestellt. Die MALDI-Cluster sind mit den römischen Ziffern I-VI gekennzeichnet. Auf der x-Achse wird die Ähnlichkeit bzw. auf der y-Achse die Anzahl der generierten Massenspektren dargestellt.

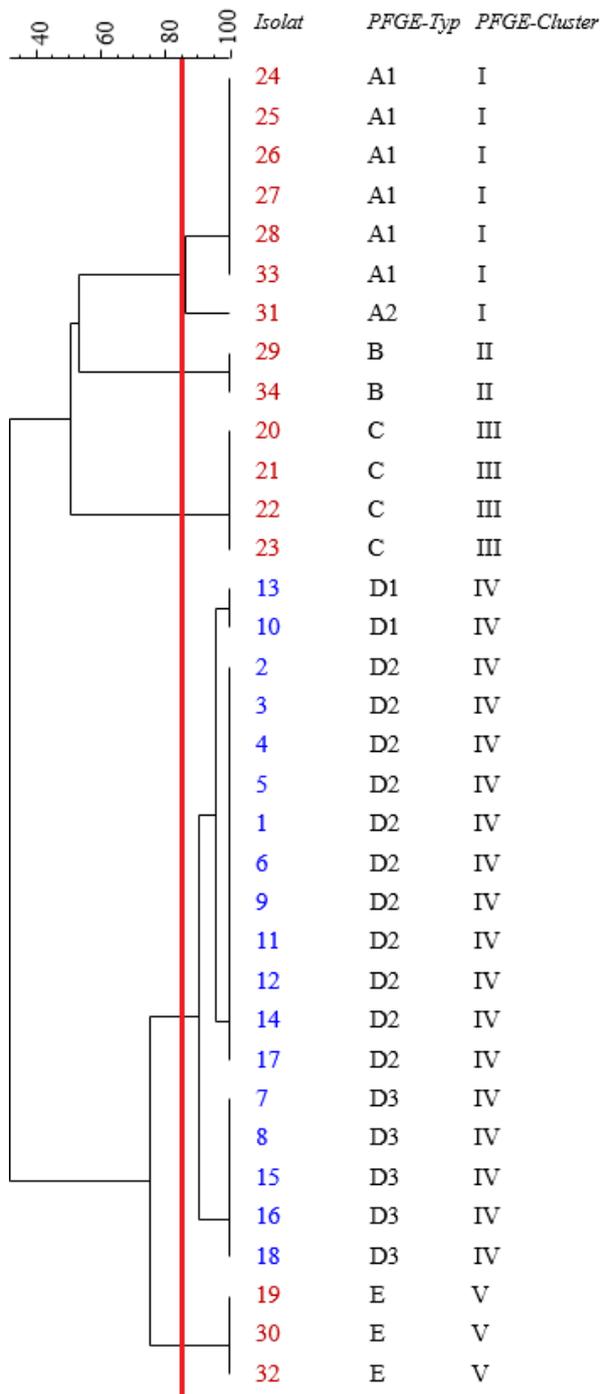


Abbildung 17: Dendrogramm der 34 MRSA-Isolate aus Masthähnchenbestand M1 und M2 basierend auf den Cfr9I-Makrorestriktionsmustern:
 Die Verwandtschaftsanalyse wurde mit Dice-Einstellung für den Koeffizienten-Vergleich und der UPAGMA Methode durchgeführt. Bei einer Übereinstimmung von über 85 % wurden Isolate als genetisch verwandt eingestuft.
 Probenschlüssel für die Isolate 1 – 34 siehe Tabelle 19

Der direkte Vergleich der beiden Ähnlichkeitsanalysen führte zu folgenden Ergebnissen: Während in der Ähnlichkeitsanalyse mittels des Computerprogrammes BioNumerics (Makrorestriktionsanalyse) insgesamt fünf PFGE-Cluster (I-V) definiert werden konnten, waren in der Clusteranalyse mittels PAST-Software (MALDI-TOF-MS) insgesamt sechs MALDI-Cluster (I-VI) (siehe Abbildung 16 und 17) zu identifizieren. Im Ergebnis ließen sich zwischen den beiden Analysen keine Übereinstimmungen nachweisen.

So beispielsweise die Isolate 19, 30 und 32 aus dem Masthähnchenbestand M2, die eine hundertprozentige Übereinstimmung in der Verwandtschaftsanalyse zeigten und einem gemeinsamen Cluster (V) zugeordnet wurden. Die Spektren der Isolate 19 und 32 kamen hier zwar in einem gemeinsamen MALDI-Cluster (IV) vor, diesem gehörten allerdings noch weitere Vertreter aus M2 bzw. einem Vertreter aus M1 an. Das Massenspektrum des Isolats 30 wurde hingegen dem MALDI-Cluster VI zugeordnet, zu welchem vorrangig Vertreter aus Masthähnchenbestand M1 gehörten.

Während die Isolate 29 und 34, als MRSA-Klone dem PFGE-Cluster II angehörten, wurden im direkten Vergleich die Spektren der Isolate 29 und 31 einem gemeinsamen MALDI-Cluster (V) zugeordnet. Das Massenspektrum des Isolats 34 gruppierte sich hingegen zum MALDI-Cluster VI.

Besonders auffällig sind auch die Spektren der Isolate 24 und 14, die im Vergleich zur PFGE-Analyse hier jeweils ein völlig eigenständiges MALDI-Cluster ausbildeten (I und II).

6 Diskussion

Im Zuge der weiterführenden molekularbiologischen Charakterisierung von ausgewählten MRSA-Stämmen, die in konventionellen Schweine- und Mastgeflügelhaltungen in den Jahren 2009 bis 2011 isoliert wurden, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine luftgetragene Verbreitung der Keime aus untersuchten Nutztierställen in deren Stallumgebung stattgefunden hat. Bereits FRIESE et al. (2012, 2013) sowie SCHULZ et al. (2012) wiesen in ihren Vorgängerstudien auf enge Zusammenhänge zwischen denen aus dem Innen- und Außenbereich der Tierbestände stammenden MRSA-Isolaten hin, die identischen *spa*-Typen angehörten. Allerdings erbrachte erst die hier durchgeführte Fragmentmusteranalyse der genomischen DNA (*Cfr9I*-Makrorestriktionsanalyse mit anschließender PFGE) den Nachweis, dass klonale Verwandtschaften zwischen den in den Tierställen zirkulierenden und in der Außenluft detektierten bzw. der Stallumgebung deponierten MRSA-Stämmen tatsächlich vorliegen. Darüber hinaus erfolgte eine MALDI-TOF-MS basierte Proteinprofil-Clusteranalyse und abschließend die Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der MALDI-TOF-MS- und der Makrorestriktionsanalyse. Dabei wurden die beiden Analyseverfahren anhand von Ergebnissen aus parallel durchgeführten Clusteranalysen miteinander verglichen, wobei jedoch keine identischen Resultate erzielt werden konnten.

6.1 Untersuchungen zur Emission von MRSA aus Nutztierhaltungen

Neben der Detektion von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Isolaten bei landwirtschaftlichen Nutztieren folgten in den letzten Jahren Studien zum Vorkommen des Erregers in der direkten Haltungsumwelt. Nachdem der positive Nachweis von MRSA auch im Tierstall gelang, stellte sich die Frage einer möglichen Emission der Keime aus dem Stallgebäude in die Umwelt. Nach aktuellem Wissenstand handelt es sich bei der vorliegenden Dissertation um die erste ausführliche, auf mehreren molekularen Feintypisierungsmethoden basierende Arbeit, die eine mögliche Emission von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* sowohl aus Schweinemast- und Schweinezuchtbeständen sowie aus Puten- und Masthähnchenbeständen in deren Stallumgebung untersucht.

6.1.1 *Spa*-Typisierung - und Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Die Ergebnisse der *spa*-Typisierung zeigten, dass in der Mehrzahl der untersuchten Schweinebestände stets ein bestimmter *spa*-Typ zirkulierte (siehe Anhang, Anlage 2). Während in den brandenburgischen Schweinemastbeständen S1 und S3 bzw. den Schweinezuchtbeständen S2 und S4 ausschließlich der *spa*-Typ t011 vorkam, dominierte in dem niedersächsischen Schweinemastbestand S6 hingegen t1451. Eine größere Diversität bei der Verteilung der *spa*-Typen zeigte lediglich ein weiterer in Niedersachsen beprobter Schweinemastbestand (S5). Im Vergleich zu den anderen Beständen wurden hier insgesamt drei unterschiedliche *spa*-Typen identifiziert, wobei t108 (84,9 %) dominierte. Die vorliegenden Typisierungsergebnisse führen somit zu der Annahme, dass sich in einzelnen Tierpopulationen bestimmte Klone festsetzen.

Zur Mehrzahl der in der nationalen und internationalen Literatur publizierten *spa*-Typen zählen die mit dem Sequenztyp ST398 assoziierten Typen t011 und t034. Allerdings beschränkt sich ihr Vorkommen nicht nur auf untersuchte Schweinehaltungen, denn ein Nachweis erfolgte auch bei beruflich exponierten Personengruppen sowie in der Lebensmittelkette selbst (DE NEELING et al., 2007; GUARDABASSI et al., 2007; KHANNA et al., 2008; VAN DUIJKEREN et al., 2008; KÖCK et al., 2009; TENHAGEN et al., 2009; ALT et al., 2011; AGERSO et al., 2012; LIM et al., 2012; DAHMS et al., 2014). Im Vergleich zu diesen Ergebnissen dominierte in unserer Studie allein t011, t034 wurde hingegen zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen. Des Weiteren wurde das Vorkommen der Typen t108 und t1451 ebenfalls von anderen europäischen Autoren (HUIJSDENS et al., 2006; DE NEELING et al., 2007; VAN DUIJKEREN et al., 2008; KÖCK et al., 2009; TENHAGEN et al., 2009; ALT et al., 2011; AGERSO et al., 2012; DAHMS et al., 2014; VAN DE VIJVER et al., 2014); und zwar bei Mast- und Schlachtschweinen beschrieben.

Zwischen allen ermittelten *spa*-Typen (t011, t108, t1451, t3479, t1344) aus S1 – S6 konnten anhand von Übereinstimmungen in der Basenabfolge der Repeat-Regionen genetische Zusammenhänge detektiert werden, die auf einen gemeinsamen Ursprung hindeuten (siehe Tabelle 12). Treten Rekombinationsvorgänge wie Deletionen oder Duplikationen von Repeats bzw. Punktmutationen auf, können Variationen innerhalb der sogenannten Repeatabfolge auftreten, die letztendlich das Auftreten verschiedener *spa*-Typen bedingen (SHOPSIN et al., 1999; KAHL et al., 2005). So können beispielsweise verschiedene *spa*-Typen wie t011, t108 und t034, ST398 als übergeordneten Sequenztyp zugeordnet werden.

Anders als in den untersuchten Schweinebeständen, in denen maßgeblich ein einzelner *spa*-Typ dominierte, zirkulierten in den vier untersuchten Putenmastbeständen (P1 – P4), deren geografische Ursprungsorte die Bundesländer Niedersachsen und Baden-Württemberg waren, zwei bis vier verschiedene Typen pro Bestand (siehe Anhang, Anlage 2). Demzufolge wurde hier eine wesentlich größere Diversität bei der Verteilung von *spa*-Typen registriert. Im Detail dominierten in den Putenmastbeständen im Tierstall sowie der Stallumgebung t011 (44,6 %), t5452 (33,9 %) und t034 (12,3). Auch RICHTER et al. (2012) wiesen t011 bei MRSA positiven Putenisolaten nach, ebenso MONECKE et al. (2013), die neben t011 auch t034, bei Isolaten von erkrankten Puten detektierten. Über den *spa*-Typ t5452 wurde in der Literatur nach aktuellem Kenntnisstand bisher nur wenig berichtet. So konnte dieser in einem belgischen Schlachthof im Zuge eines Monitorings bei lebensmittelliefernden Tieren sowie einmalig bei der Untersuchung von humanen und porcinen Isolaten, die zwischen 2010 und 2012 in polnischen Schweinebeständen generiert wurden, nachgewiesen werden (EFSA, 2015; MROCZKOWSKA et al., 2017). Die Frage nach seiner Bedeutung für die Nutztierpopulation kann aufgrund fehlender Daten, zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden.

Während im Innen- und Außenbereich von Masthähnchenbestand M1 und M2 der *spa*-Typ t1430 (53,7 %) dominierte, war in vier Fällen auch der Nachweis von t899 möglich. Das Vorkommen dieser beiden Typen wurde ebenfalls von DULLWEBER (2010) oder NEMEGHAIRE et al. (2013) beim Geflügel beschrieben (DULLWEBER, 2010; NEMEGHAIRE et al., 2013).

FRIESE et al. (2012, 2013) sowie SCHULZ et al. (2012) äußerten in den bereits erwähnten Vorgängerstudien zu dieser Arbeit die Vermutung, dass auf Grund identischer ermittelter *spa*-Typen, die bei Isolaten aus dem Innen – und Außenbereich der Nutztierhaltungen detektiert wurden, eine luftgetragene Verbreitung von MRSA in die Umwelt stattgefunden haben könnte. Bereits einige Jahre zuvor untersuchten VAN DUIJKEREN et al. (2008) Schweinebestände unterschiedlicher Haltungsformen (z.B. Sauenzucht-, Ferkelaufzucht- oder Schweinemastbestände) in den Niederlanden bezüglich einer potentiellen Transmission von MRSA. Da in Beständen, die eine epidemiologische Beziehung zueinander aufwiesen, identische *spa*-Typen detektiert wurden, schlussfolgerten die Autoren, dass die Transmission von MRSA zwischen den Betrieben auf den Zukauf kolonisierter Schweine zurückgeführt werden könne.

In zahlreichen nationalen und internationalen Publikationen wurde die Zugehörigkeit der dominierenden *spa*-Typen t011, t034 und t108 zu dem hauptsächlich bei Nutztieren vorkommenden klonalen Komplex CC398 beschrieben. Im Vergleich dazu zeigte eine am Universitätsklinikum Münster langjährig angelegte Studie, dass auch die untersuchten

humanen MRSA-Isolate dem klonalen Komplex CC398 zugeordnet werden konnten und auch hier die *spa*-Typen t011, t034 und t108 dominierten. Das Klinikum liegt im Nordwesten Deutschlands, nahe der niederländischen Grenze. Dieses sogenannte EUREGIO-Gebiet stellt eine besonders viehdichte Region dar, was nach Annahme der Autoren das vermehrte Auftreten von CC398 MRSA-Stämmen in dortigen Nutztierbeständen und auch bei der Bevölkerung erklärt (VAN ALEN et al., 2017). Mittels MLST kann diese Annahme jedoch nicht nur für genannte, sondern auch für weitere in dieser Studie identifizierte *spa*-Typen (t5452, t1250, t1580, t1451, t3479, t1344) bestätigt werden. Insgesamt gehörten 87% der in dieser Arbeit untersuchten MRSA-Stämme CC398 an.

Bei den übrigen Isolaten (13%) handelte es sich um sogenannte Non-CC398 MRSA-Stämme, die den *spa*-Typen t1430 bzw. t899 und t002 angehörten und mittels Typisierung den Sequenztypen ST9 und ST5 zugeordnet wurden. Auch FESSLER et al. (2011), die verschiedenen Geflügelfleischproben sowie MONECKE et al. (2013) die Isolate von klinisch kranken Puten näher untersuchten, detektierten MRSA-Stämme der *spa*-Typen t1430 und t002, die ebenfalls mit ST9/CC9 bzw. ST5/CC5 assoziiert waren. Ausführungen des Bundesinstitut für Risikobewertung bestätigen ebenfalls diese Beobachtungen, wonach neben den in Nutztierbeständen weit verbreiteten CC398, häufig auch ST9 (Masthähnchenfleisch) und ST5 (Putenfleisch und -karkassen) in Geflügelfleisch detektiert werden (BFR, 2009a).

Auf Grund der Dominanz von ST398 in der Nutztierhaltung wird in der Literatur häufig der Begriff „Nutztier-assoziiert“ verwendet. Allerdings sind nicht alle MRSA-Stämme, die bei Nutztieren isoliert werden, ausnahmslos ST398 zuzuordnen. Neben Studien von MEEMKEN et al. (2010), LIM et al. (2012, 2013), RICHTER et al., (2012) oder GRAVELAND et al., (2010) bestätigen dies auch die vorliegenden MLST-Typisierungsergebnisse (ST9, ST5) aus unserer Arbeit. Das RKI weist darauf hin, dass MRSA CC398 eine wenig ausgeprägte Wirtsspezifität besitzen und im Zusammenhang mit Infektionen bei Pferden und kleinen Haustieren stehen (WITTE et al., 2007b), was LONCARIC & KUNZEL (2013) sowie VINCZE et al. (2014) in ihren Studien bestätigen.

Demzufolge muss die Verwendung des Begriffs „livestock-associated bzw. Nutztier-assoziiert“ im Zusammenhang mit MRSA CC398 kontroverser diskutiert werden.

6.1.2 Analyse der klonalen Verwandtschaft

Insgesamt wurde bei 124 ausgewählten MRSA-Isolaten eine detaillierte Stammtypisierung mit dem Ziel durchgeführt, den Nachweis einer luftgetragenen Verbreitung von MRSA aus Nutztierställen in deren Umwelt zu erbringen. Hierzu erfolgte nach Makrorestriktion mit *Cfr9I* eine anschließende Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Pulsfeldgelelektrophorese, wobei insgesamt 44 verschiedene PFGE-Muster identifiziert wurden, die wiederum 24 definierten PFGE-Clustern angehörten (siehe Abbildung 10 – 12).

Analyse der klonalen Verwandtschaft in Masthähnchenbeständen

Von den 34 MRSA-Isolaten aus Masthähnchenbestand M1 und M2 müssen besonders jene hervorgehoben werden, die zeitgleich im Tierstall und in der Stallumgebung detektiert wurden und in der Verwandtschaftsanalyse mittels PFGE eine hundertprozentige klonale Übereinstimmung zeigten (siehe Abbildung 10, PFGE-Muster B und E). Das Vorkommen von MRSA-Klonen im Innen- und Außenbereich dieser Mastbestände beweist, dass eine Transmission von MRSA zwischen Tierstall und Umgebung stattgefunden hat. Da die Keime aber nur auf stallumliegenden Bodenoberflächen nachgewiesen wurden und nicht in der Außenluft selbst, bleibt ungeklärt ob, hier tatsächlich eine aerogene oder viel eher eine fäkale Emission mit anschließender Deposition bzw. ein Austrag über Vektoren wie beispielsweise über Fahrzeuge oder Personen erfolgt ist. FRIESE et al. (2013) detektierten in der Vorgängerstudie zu dieser Arbeit nur einmalig MRSA in einer Sammelkotprobe. Das aus M1 stammende Isolat (siehe Abbildung 10, PFGE-Muster D3) verdeutlicht, dass durch den fehlenden Nachweis einer aerogenen Emission des Erregers in den untersuchten Masthähnchenbeständen, die Möglichkeit eines fäkalen Austrags durchaus in Betrachtung gezogen werden muss. Der Beweis, dass MRSA auch im Kot nachweisbar sind, konnte im Zuge einer Studie, die über zwei Jahre in einem Universitätsklinikum durchgeführt wurde, erbracht werden (KLOTZ et al., 2005). Das BfR weist darauf hin, dass Erreger grundsätzlich über die Ausbringung von Dung in die Umwelt gelangen können. „Wie persistent *S. aureus* in Dung und in der Umwelt sind, ist jedoch nicht bekannt, so dass die Bedeutung dieses Expositionspfades bisher nicht bewertet werden kann“ (BFR, 2009b). Demzufolge kann hier über die Richtung der Transmission selbst nur spekuliert werden, wenn auch ein MRSA-Austrag wesentlich wahrscheinlicher erscheint als ein Eintrag von MRSA aus der Umwelt in den Stall.

Bei der detaillierten Betrachtung der minimalen festgestellten Ähnlichkeit zwischen den generierten PFGE-Clustern (32,1 %, Daten in Abbildung 10 nicht gezeigt), ließen sich insgesamt zwei übergeordnete Cluster unterscheiden. Während dem ersten Cluster ausschließlich CC398 MRSA-Stämme angehörten, kamen im zweiten Cluster nur Isolate des

Sequenztyps ST9 vor (siehe Abbildung 10). Demzufolge scheint hier die Zuordnung eines MRSA-Isolates zu einem der beiden Cluster mit der Zugehörigkeit zum Sequenztyp ST9 bzw. zum klonalen Komplex CC398 zu korrelieren.

Des Weiteren war anhand der generierten PFGE-Muster festzustellen, dass die MRSA-Stämme innerhalb ihrer definierten Cluster nicht nur demselben Sequenztypen bzw. klonalen Komplex angehörten, sondern auch zu identischen *spa*-Typen bzw. zu solchen mit denen sie laut Tabelle 12 genetisch in Zusammenhang stehen. Die Identifizierung des *spa*-Typs für einzelne klonale Linien stellt gewissermaßen eine weiterführende epidemiologische Feintypisierung dar, durch die eine Unterscheidung in Subklone ermöglicht wird (RKI, 2011). Von einem ermittelten *spa*-Typ jedoch direkt auf die Zugehörigkeit zu einem ST bzw. CC zu schließen, ist „über begrenzte Zeiträume und geografische Regionen gut möglich, darüber hinaus sind tiefer gehende Analysen erforderlich, da bei MRSA bestimmte klonale Linien offenbar unabhängig voneinander durch weit verbreitete und empfindliche Vorläufer entstehen können (z. B. MRSA ST5)“ (RKI, 2009).

Analyse der klonalen Verwandtschaft in Putenmastbeständen

Im Zuge der Analysen wurden insgesamt 30 MRSA-Isolate, die aus zwei ausgewählten Putenmastbeständen (P1, P2) stammten, weiterführend untersucht. Analog zu den Ergebnissen aus den Masthähnchenbeständen kamen im Tierstall (Sockentupfer-, Choanentupfer-, Sammelkot, Sammelstaub- und Luftproben) und der Stallumgebung (Sockentupfer- und Luftproben) ebenfalls Isolate vor, deren Makrorestriktionsmuster in der klonalen Verwandtschaftsanalyse eine hundertprozentige Übereinstimmung zeigten (siehe Abbildung 11, PFGE-Muster K2). Darüber hinaus war in Bestand P2 erstmalig die Detektion von MRSA-Klonen in Luftproben aus dem Innen- und Außenbereich und zwar bis zu einer Entfernung von 150 m auf der windabgewandten Seite des Bestandes möglich. Da die Luftprobenahmen innen und außen simultan erfolgten, kann hier tatsächlich von einer aerogenen Emission der Erreger aus dem Tierstall in die Stallumgebung ausgegangen werden. Von einer luftgetragenen Emission aus Schweinebeständen berichten auch GIBBS et al. (2006) sowie GREEN et al. (2006). So führten die Autoren ebenfalls Luftprobenahmen zum Nachweis von antibiotika-resistenten Bakterien im Stallinnern aber auch auf der windabgewandten Seite (25 m) und der windzugewandten Seite (25 m, 50 m, 100 m, 150 m) eines amerikanischen Schweinebetriebes durch. Insgesamt wurden zwei Gruppen von kultivierbaren Bakterien detektiert, wobei *Staphylococcus aureus* mit einem Anteil von 76 % am häufigsten vorkam. Die Erreger waren noch in einer Entfernung von 150 m nachweisbar. Die luftgetragene Verbreitung von multiresistenten Keimen stellt nach GIBBS et al. (2006) nicht nur für das Betriebspersonal, sondern auch für Anwohner in der

Umgebung eine Gesundheitsgefährdung dar, so dass sie zu einer Mindestentfernung von 200 m zwischen den Tierhaltungen und Wohngebieten anraten.

Zusätzlich zeigte ein weiteres Isolat aus P2 (P2-ST-Luv100) eine Ähnlichkeit von 90,4 % gegenüber zwei Isolaten aus dem Tierstall von P1 (Daten nicht gezeigt in Abbildung 11). Im Detail handelte es sich hier um einen Umgebungstupfer aus dem Stall sowie einen Hauttupfer, der vom Tierhalter selbst stammte (siehe Abbildung 11, PFGE-Cluster VI). Alle Isolate dieses Clusters waren MRSA CC398, die dem *spa*-Typ t034 zugeordnet wurden. Demzufolge konnte im Zuge der durchgeführten Verwandtschaftsanalyse trotz der unterschiedlichen geografischen Lage der beiden Betriebe (Niedersachsen und Baden-Württemberg) ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen diesen MRSA-Isolaten nachgewiesen werden. Die naheliegende Vermutung, dass die Verwandtschaft der Isolate darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Küken aus identischen Herkunftsbetrieben stammten, musste jedoch anhand der Auswertung der betrieblichen Befragung, die keine gemeinsame Bezugsquelle der Küken für diese beiden Betriebe ergab, revidiert werden. Im Gegensatz dazu wiesen VAN DUIJKEREN et al. (2008) MRSA-Isolate mit identischen *spa*-Typen (t899) in Schweinemastbeständen sowie deren jeweiligen Herkunftsbetrieben nach. Das Ergebnis weist hier darauf hin, dass eine MRSA-Kolonisierung sehr wahrscheinlich durch den Zukauf von bereits kolonisierten Schweinen stattgefunden hat (VAN DUIJKEREN et al., 2008).

Wie auch in den Masthähnchenbeständen gehörten die typisierten MRSA-Stämme aus P1 und P2 innerhalb ihrer definierten Cluster jeweils identischen *spa*-Typen an.

Ähnlichkeiten zwischen mehreren Isolaten derselben Probe

In einem zusätzlichen Arbeitsschritt wurden aus einer ursprünglichen Probe bis zu fünf weitere Isolate (A – E) generiert. Im Detail handelte es sich hier um insgesamt vier ausgewählte Sockentupferproben, die aus den Geflügelmastbeständen P1 und M2 stammten. Zielstellung war es zu überprüfen, ob es sich bei den Isolaten derselben Probe tatsächlich um identische MRSA-Klone handeln würde oder nicht.

Zusammenfassend ließ sich zwischen den generierten Isolaten einer jeden Ursprungsprobe der Nachweis einer klonalen Verwandtschaft erbringen (siehe Abbildung 10, 11). Nur eine Sockentupferprobe zeigte deutliche Diversitäten bei der Auswertung. So gehörten die fünf MRSA-Isolate aus der Umgebungs-Sockentupferprobe (M2-ST-Lee50-A – E) insgesamt vier unterschiedlichen PFGE-Mustern an.

Diese Untersuchungsergebnisse zeigten, dass nicht alle aus der Ursprungsprobe erhaltenen Isolate demselben MRSA-Klon zuzuordnen sind. Somit stellt sich die Frage, ob in der Laborarbeit routinemäßig mehrere Isolate aus einer Probe gewonnen werden sollten, um eine eindeutige epidemiologische Einordnung von MRSA-Stämmen zu gewährleisten. Das Bundesinstitut für Risikobewertung empfiehlt bei der Aufklärung von Ausbruchsgeschehen

entlang der Lebensmittelkette „aus einer Probe mehrere Isolate (in der Regel n=5)“ zu gewinnen, da Bakterien existieren (wie z. B. *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*), von denen man weiß, dass sie in „der gleichen Probe in verschiedenen Serovaren vorkommen können“ (BFR, 2016). Dieser Grundsatz sollte aufgrund der hier erlangten Erkenntnisse künftig ebenfalls bei der Untersuchung von MRSA Anwendung finden.

Analyse der klonalen Verwandtschaft in Schweinebeständen

Nach unserem aktuellen Wissenstand existiert bisher keine vergleichbare Publikation, in der MRSA-Stämme in unterschiedlichen Schweinehaltungen zu unterschiedlichen Jahreszeiten isoliert und mittels Makrorestriktionsanalyse weiterführend feintypisiert wurden. .

Besonders deutlich zeigen die Typisierungsergebnisse aus den Schweinebeständen (siehe Abbildung 12), dass trotz der Zugehörigkeit aller MRSA-Isolate zu *spa*-Typ t011, insgesamt 24 verschiedene Restriktionsprofile ermittelt werden konnten. Demzufolge besitzt die Methode hier im Vergleich zu MLST oder *spa*-Typisierung eine noch höhere Diskriminierungsfähigkeit, was BOSCH bereits in ihrer Studie anmerkten (BOSCH et al., 2010).

Analog zu den Ergebnissen aus P2 wurden auch in den untersuchten Schweinebeständen klonale Verwandtschaften zwischen Isolaten aus dem Tierstall (Nasentupfer-, Sammelstaub- und Luftproben) und aus der Stallumgebung (Sockentupferproben von 50 m – 1000 m Lee) detektiert. Darüber hinaus gelang ebenfalls der Nachweis eines MRSA-Klons im Tierstall sowie in einer Außenluftprobe und zwar in einer Entfernung von 50 m Lee (siehe PFGE-Muster V6). Da in S2 die Luftprobenahmen innen und außen simultan erfolgten, ist wie bereits in P2 davon auszugehen, dass eine aerogene Emission von MRSA aus dem Tierstall in die Stallumgebung stattgefunden hat.

Des Weiteren war in Betrieb S3 ein Nachweis von MRSA-positiven Sockentupfern noch bis zu einer Entfernung von 500 m und sogar 1000 m Lee möglich (siehe PFGE-Muster P, V1), wobei eine Transmission von MRSA durch die kontaminierte Umwelt von benachbarten Beständen oder durch Tiere, die im Umfeld solcher Anlagen leben, nicht sicher ausgeschlossen werden kann (SCHULZ et al., 2012).

Schließlich zeigten auch MRSA-Isolate aus unterschiedlichen schweinehaltenden Betrieben eine Übereinstimmung von 100 % in der klonalen Verwandtschaftsanalyse (siehe Abbildung 12, PFGE-Muster T1, V1). Während es sich bei Pulsfeldmuster T1 um MRSA-Klone aus den Tierställen von S1 und S3 handelte, gehörten Pulsfeldmuster V1 eine Hauttupferprobe aus S2 sowie Proben aus dem Tierstall sowie der Umgebung von S3 an. Alle zuvor genannten Schweinebestände hatten ihren geografischen Ursprung im Bundesland Brandenburg.

Zusätzlich wurde eine genomische Ähnlichkeit von 94,7 % zwischen einer Luftprobe aus dem

Tierstall von S1 und einer Nasentupferprobe aus S2 ermittelt (siehe Abbildung 12, PFGE-Cluster XV).

Nach Gardner et al. (2002) spielen nicht nur das Herdenmanagement, sondern auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle beim Eintrag eines Erregers in einen Schweinebestand. Des Weiteren steigt für große Bestände, die sich eher in Regionen mit hohen Viehdichten ansiedeln, das Risiko einer Übertragung mit Pathogenen, als es für kleine Betriebe der Fall ist, die sich häufiger in viehärmeren Regionen ansiedeln (GARDNER et. al 2002).

6.2. Tenazität emittierter und deponierter MRSA in der Stallumgebung von Schweinebeständen unter verschiedenen Umweltbedingungen

SCHULZ et al. (2012) zeigten in ihrer Vorgängerstudie, dass signifikant höhere MRSA-Detektionsraten in den von der Lee-Seite stammenden Sockentupferproben nachgewiesen werden konnten. Folglich kamen die Autoren zu der Annahme, dass hier ein aerogener Austrag von MRSA aus dem Tierstall am wahrscheinlichsten sei. Des Weiteren lieferten die Untersuchungsergebnisse Anhaltspunkte dafür, dass die in der Stallumgebung deponierten MRSA für längere Zeit in der Umgebung überdauerten und deshalb eine beträchtliche Umweltenazität zu besitzen scheinen. Um dieser Vermutung jedoch detaillierter nachgehen zu können, erfolgte im Zuge dieser Arbeit eine weiterführende molekularbiologische Charakterisierung von ausgewählten MRSA-Isolaten, die aus drei verschiedenen Schweinebeständen (S1, S2, S3) stammten und ausschließlich dem *spa*-Typ t011 angehörten. Im Detail fiel die Wahl auf solche Isolate, die während der Sommer- und Winterprobenahme generiert wurden, um eine Gegenüberstellung von Jahreszeiten mit den größten klimatischen Unterschieden zu ermöglichen.

Im Zuge der vergleichenden Analyse ließen sich in Schweinebestand S1, während der Sommer- sowie der Winterprobenahme identische MRSA-Klone identifizieren. Im Detail handelte es sich um Sockentupferproben, die in identischen Entfernungen (siehe Abbildung 12, PFGE-Muster S2) bzw. unterschiedlichen Distanzen (siehe Abbildung 12, PFGE-Muster O2) auf der Lee-Seite der Bestände isoliert wurden.

Da die Winterprobenahme bereits Ende 2009 erfolgte und somit vor der Sommerprobenahme im Juni 2010 abgeschlossen war, könnte angenommen werden, dass genannte MRSA-Stämme über mehrere Monate in der Umwelt überdauert haben müssen, was wiederum die Annahme von SCHULZ et. al (2012) bezüglich einer erheblichen Umweltenazität von in der Stallumgebung deponierten MRSA bekräftigen würde.

Allerdings könnte anhand der Analyseergebnisse ebenso geschlussfolgert werden, dass entsprechende MRSA-Stämme im Sommer erst frisch emittiert wurden. Dies muss zumindest

für MRSA-Klone des Pulsfeldmusters O2 in Betracht gezogen werden, da im Vergleich zu Isolaten des PFGE-Musters S2 zusätzlich auch eine MRSA-positive Stallluftprobe in der Sommerprobenahme isoliert werden konnte.

Darüber hinaus erfolgte in S1 der Nachweis eines MRSA-Klons in einer Nasentupferprobe im Winter, der in der darauffolgenden Probenahme im Sommer in der Stallluft nachgewiesen wurde (siehe PFGE-Muster S1, Abbildung 12). Da alle übrigen Isolate aus der Sommerprobenahme anderen PFGE-Mustern zugeordnet wurden, muss hier ebenfalls von einer früheren aerogenen Emission des MRSA-Klons und einer erheblichen Umwelttenazität ausgegangen werden. Auch in Schweinebestand S3 konnten dieselben MRSA-Klone in Sockentupferproben im Winter und Sommer identifiziert werden (siehe PFGE-Muster R, Abbildung 12). Während ein Isolat im Winter auf der windzugewandten Luv-Seite (100 m) detektiert wurde, kam das andere in der Sommerprobenahme auf der windabgewandten Seite (50 m) des Bestandes vor. Als Faktoren für eine mögliche Verschleppung könnten das Personal, landwirtschaftliche Maschinen oder Geräte sowie Windrichtungswechsel oder Schädlinge in Betracht gezogen werden. Laut SCHULZ et al. (2012) kann zumindest ausgeschlossen werden, dass luftgetragene MRSA aus anderen Tierbeständen deponiert sein könnten, da diese nicht in unmittelbarer Umgebung der untersuchten Schweinebestände angesiedelt waren.

Schließlich fiel bei den vergleichenden Analysen auch folgender interessanter Sachverhalt auf: Zu keinem Zeitpunkt wurden MRSA-Isolate von Tieren (Nasen- oder Hauttupferproben), die z.B. aus der Sommerprobenahme stammten, im Mastdurchgang im Winter detektiert und umgekehrt. Dies lässt vermuten, dass MRSA bereits in den Ferkelerzeugerbetrieben erworben wurden und in den untersuchten Schweinebeständen, Erreger erfolgreich durch Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen vor der nächsten Einstellung eliminiert werden konnten. Darüber hinaus erfolgte auch der Nachweis von identischen MRSA-Klonen in völlig verschiedenen Schweinebeständen, was wiederum bestätigen würde, dass in der Schweinepopulation sogenannte Schweine assoziierte MRSA-Klone kursieren (HUIJSDENS et al., 2006; DE NEELING et al., 2007; VAN DUIJKEREN et al., 2007).

6.3 Anwendbarkeit unterschiedlicher Verfahren zur molekulargenetischen Typisierung

Um epidemiologische Zusammenhänge zwischen Erregerstämmen zu detektieren, finden vor allem genotypische Methoden in der Routinediagnostik Anwendung. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden nicht nur DNA-sequenzbasierte Analyseverfahren wie die Single-Locus-Sequenz-Typisierung des *spa*-Gens, das Multi Locus Sequence Typing sowie die Microarray-Technologie eingesetzt, sondern auch die *Cfr9I*-Makrorestriktionsanalyse mit anschließender PFGE. Die Auswahl der geeignetsten Typisierungsmethode wird dabei vor allem durch

Parameter wie Diskriminierungsfähigkeit, Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Stabilität bestimmt (STRUELENS, 1996).

Zusammenfassend überzeugen DNA-sequenzbasierte Methoden durch ihre leichte Durchführbarkeit, Reproduzierbarkeit und Austauschbarkeit von Ergebnissen zwischen verschiedenen Forschungseinrichtungen. Im Vergleich zur MLST besitzt dabei die Typisierung des *spa*-Gens auf Grund einer höheren Diskriminierungsfähigkeit, schnelleren Durchführbarkeit sowie des geringeren Kosten- und Personenaufwandes eine weite Verbreitung in der Routinediagnostik (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008; FRIEDRICH et al., 2008). Ursachen für den erhöhten Arbeits- und Kostenaufwand liegen bei der MLST darin begründet, dass insgesamt sieben PCR-Reaktionen pro MRSA-Isolat für die Sequenzierung der sieben Haushaltsgene (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *tpi*, *yqil*) notwendig sind. Inzwischen findet die Ganzgenomsequenzierung, als hochauflösende molekulare Typisierungsmethode, bei der Aufklärung von Ausbruchsgeschehen Anwendung, da sie eine schnelle Unterscheidung zwischen Ausbruchs- und Nicht-Ausbruchs-Isolaten ermöglicht (GILCHRIST et al., 2015). Jedoch stand sie zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht in ausreichendem Umfang zur Verfügung.

Die Pulsfeldgelelektrophorese wurde lange Zeit aufgrund ihrer hohen Diskriminierungsfähigkeit als „Goldstandard“ in der Typisierung von verschiedenen Bakterienspezies angesehen (BENS et al., 2008). Als Nachteile dieser technisch anspruchsvollen Methode sind jedoch eine mangelnde Vergleichbarkeit zwischen Laboren und mangelnde Reproduzierbarkeit von Ergebnissen sowie der hohe Zeit-, Kosten- und Personalaufwand zu benennen (WICHELHAUS et al., 2000; TE WITT et al., 2010). Eine mangelnde Reproduzierbarkeit von Untersuchungsergebnissen war auch im Rahmen dieser Arbeit feststellbar, so dass Modifizierungen am Arbeitsprotokoll vorgenommen werden mussten (siehe Punkt 4.2.5). Von derart notwendigen Veränderungen - ähnlich den unseren (z.B. Verlängerung der Inkubationszeiten für Lysostaphin und Proteinase K sowie dem Restriktionsenzymverdau, weiterführende Modifikationen der PFGE-Laufbedingungen) - berichtete bereits BOSCH et al. (2010). Dementsprechend stellt sich die Frage, ob durch weiterführende Studien eine Überarbeitung am Versuchsprotokoll angestrebt werden sollte, um die Validität der PFGE für MRSA ST398 zu verbessern.

Letztendlich liefern laut STROMMENGER et al. (2006, 2008) oder auch MELLMANN et al. (2008) *spa*-Typisierung, MLST und PFGE weitestgehend übereinstimmende Typisierungsergebnisse. Dieser Nachweis konnte ebenfalls durch die weiterführende genotypische Charakterisierung ausgewählter MRSA-Isolate im Zuge Studie erbracht werden. So ließen sich die Isolate eines jeden PFGE-Cluster stets demselben *spa*-Typen bzw. CC/ST zuordnen (siehe Punkt 5.4.1). Von einem ermittelten *spa*-Typ jedoch auf die Zugehörigkeit zu

einem entsprechendem ST/CC zu schließen, ist nach Ausführungen des RKI wie bereits erwähnt nur „über begrenzte Zeiträume und geografische Regionen gut möglich...“ (RKI, 2009). In den letzten Jahren führte jedoch das sogenannte Next Generation Sequencing (NGS) zu einer rasanten und zugleich revolutionären Entwicklung in der DNA-Sequenzierungstechnologie. Diese neuartigen genanalytische Verfahren bieten die Möglichkeit, eine große Anzahl von DNA-Molekülen parallel zu sequenzieren, so wird beispielweise beim „whole genome sequencing“ (WGS) das gesamte Genom sequenziert. Waren Zeit- und Kostenaufwand vor allem für kleinere Forschungslabore zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie noch sehr hoch, sind diese inzwischen exponentiell gefallen. Daher werden bereits jetzt die Next Generation Sequencing-Technologien als neuer Goldstandard in der molekulargenetischen Analyse angesehen, wohingegen die Anforderungen an die Interpretation der gewaltigen Datenmengen zweifellos gestiegen sind.

6.4 Relevante Pathogenitätsfaktor- und Antibiotikaresistenz-Gene ausgewählter MRSA-Isolate

Um das pathogene Verhalten luftgetragener und in der Umwelt sedimentierter MRSA sowie ein mögliches potentiell Risiko für umliegende Tierbestände bzw. Anwohner abschätzen zu können, fand bei einer Auswahl von insgesamt 38 MRSA-Isolaten eine Microarray-gestützte Genotypisierung statt (siehe Tabelle 18).

Zusammenfassend ließen sich bei allen untersuchten Isolaten (100 %) das Methicillin-Resistenzgen *mecA* sowie das Penicillin-Resistenz vermittelnde β -Lactamase-Gen *blaZ* nachweisen. Darüber hinaus wurde weitere Antibiotikaresistenzgene regelmäßig detektiert, wobei hier die Makrolid-Lincosamid-Streptogramin- (76 %) und Tetrazyklin-Resistenzdeterminanten (63 %) am häufigsten auftraten.

Obwohl das Vorkommen von Tetrazyklin-Resistenzdeterminanten charakteristisch für MRSA CC398 ist (ASPIROZ et al., 2010; ALT et al., 2011), gehen unsere Untersuchungsergebnisse mit dem Trend einher, dass Resistenzen von Staphylokokken gegen Antibiotika wie Tetrazykline, aber auch gegen Makrolide oder Aminoglykoside rückläufig sind. Das RKI weist darauf hin, dass bei humanen Isolaten „verstärkt das Auftreten „neuer“ Epidemiestämme beobachtet wird, die ein deutlich schmaleres Resistenzspektrum zeigen als jene vor zehn Jahren“ (RKI, 2013).

Im Zuge der Auswertung fiel auf, dass die Tetrazykline-Resistenzgene *tetK* und *tetM* vermehrt bzw. das Trimethoprim-Resistenzgen *dhfrA* ausschließlich in den untersuchten Schweinebeständen auftraten. ALT et al. (2011) wiesen in deutschen Schweinemastbeständen bei allen MRSA-positiven Isolaten eine Tetrazyklinresistenz nach sowie bei einer Vielzahl der Isolate eine Resistenz gegenüber Trimethoprim.

Nur einmalig erfolgte der Nachweis des Streptothricin-Resistenzgens *sat* in einem der

Putenmastbestände. In der DDR wurde Anfang der 1980er Jahre das Antibiotikum Nourseothricin, ein Streptothricin-Antibiotikum als Leistungsförderer in der Schweinemast eingesetzt, bereits wenige Jahre später ließen sich erste Resistenzen in *E.coli*-Isolaten nachweisen (HUMMEL et al., 1986).

Bezüglich der Abschätzung eines möglichen pathogenen Potentials der untersuchten MRSA-Stämme zeigten 12 der 38 ausgewählten Isolate (31,6 %) eine grundsätzliche Fähigkeit zur Bildung von Staphylokokken-Enterotoxinen (SEG, SEI, SEIJ, SEIM, SEIN, SEIO, SEIQ, SEIU). Entsprechende Isolate stammten ausschließlich aus Masthähnchen- und Schweinebeständen. In keinem der Putenhaltungen war ein Enterotoxin-Nachweis möglich. Derzeit sind mehr als 20 verschiedene SE-Typen bekannt, wobei den fünf „klassischen“ Enterotoxinen A – E (SEA – SEE), als Verursacher von humanen Lebensmittelintoxikationen, weiterhin die größte Bedeutung zukommt (BECKER et al., 2007; ARGUDIN et al., 2010a). Von den identifizierten Enterotoxinen zeigten nur SEG und SEI eine emetische Aktivität im Affenfütterungstest, hingegen rief SEIQ im Primatenmodell keine Emesis hervor (MUNSON et al., 1998; ORWIN et al., 2002).

Somit besitzen entsprechende MRSA-Stämme eine grundsätzliche Fähigkeit zur Bildung von Staphylokokken-Enterotoxinen (SE). Inwiefern die SE-Typen SEIM und SEIJ, die zu den neuen Enterotoxinen zählen, eine enterotoxische Wirkungsweise besitzen, muss nach BECKER et al. (2007) und ARGUDIN et al. (2010a) noch in weiterführenden Studien geklärt werden. Auch welche Rolle den nachgewiesenen Genen des *egc*-Clusters (SEG, SEI, SEIM, SEIN, SEIO und SEIU) bei lebensmittelbedingten Intoxikationen zukommt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Unbestritten ist jedoch ihre superantigenetische Wirkungsweise (ARGUDIN et al., 2010a).

Einige *Staphylococcus aureus* Stämme bilden eine antiphagozytär wirkende Polysaccharidkapsel aus. Bisher wurden elf unterschiedliche Sero- bzw. Kapseltypen beschrieben (O'RIORDAN & LEE, 2004). Laut RKI dominieren dabei die Kapseltypen 5 und 8. Im Rahmen unserer Untersuchungen detektierten wir bei allen 38 MRSA-Isolaten Gene, welche mit dem Kapseltyp 5 assoziiert sind (*cap5*, *cap-H5*, *capJ5*, *capK5*). Auch andere Autoren wiesen in ihren Studien vor allem den Kapseltyp 5 aber auch Kapseltyp 8 assoziierte Gene in MRSA-Isolaten aus Nutztierhaltungen nach (POUTREL & SUTRA, 1993; KADLEC et al., 2009; FESSLER et al., 2010; FESSLER et al., 2011; MONECKE et al., 2013). Inwiefern diesen beiden Serotypen allerdings ein pathogenes Potential besitzen, wird in der Literatur bisher kontrovers diskutiert (THAKKER et al., 1998).

Einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus* ist jedoch die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen. Bei allen 38 MRSA-Stämmen wurden die Biofilm-assoziierten Gene des *ica*-Operon detektiert. Im Detail kam bei 36 Isolaten (94,7 %) *icaA*, bei 31 (81,6 %) *icaC*

und bei 28 (73,7 %) *icaD* vor. Biofilme bestehen aus sessilen Bakterienpopulationen, die an einer Grenzfläche anheften, und charakteristischerweise von einer extrazellulären, polymeren Substanz (EPS) umschlossen sind (KOKARE et al., 2009). Die Gene des *ica*-Operon kodieren für das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA), welches in der Biofilmproduktion zur Zell-Zell-Adhäsion führt (HEILMANN et al., 1996). Durch Biofilmbildung können Bakterien nicht nur auf Veränderungen in der Umwelt reagieren, sondern auch ihr weiteres Überdauern sichern.

Die Interaktion von *Staphylococcus aureus* mit entsprechenden Wirtstrukturen, zu denen extrazelluläre Matrixmoleküle und Plasmaproteine zählen, wird durch spezielle bakterielle Oberflächenproteine, sogenannte Adhäsine, vermittelt (CLARKE & FOSTER, 2006). Diesen gehören unter anderem MSCRAMMs (microbial surface components recognising adhesive matrix molecules) an, die kovalente Bindungen mit dem Peptidoglykan der Zellwand eingehen und deshalb als sogenannte „*cell wall-anchored (CWA) proteins*“ bezeichnet werden (FOSTER et al., 2014). CWA-Proteine lassen sich in insgesamt vier Klassen unterteilen, wovon die MSCRAMMs die größte und bedeutsamste Klasse bilden. Zu ihren wichtigsten Vertretern zählen die Clumping Faktoren A und B (*clfA*, *clfB*), die Fibronectinbindende Proteine A und B (*fnbA*, *fnbB*), das Kollagen-bindende Adhäsion (*cna*), aber auch das von uns detektierte serine-aspartate repeat protein C (*sdrC*) sowie das bone sialoprotein-binding protein (*bbp*) (FOSTER et al., 2014). Insgesamt zeigten die Isolate aus unserer Studie, unabhängig ob sie Außen oder Innen isoliert wurden, eine unterschiedliche Ausstattung mit Adhäsionsfaktoren wie beispielsweise den zuvor genannten MSCRAMM kodierenden Genen (siehe Tabelle 18).

Des Weiteren war bei keinem der 38 ausgewählten MRSA-Isolaten der Nachweis des Panton-Valentine Leukozidin Gens (*lukF/S-PV*) möglich. Das Fehlen des PVL-Gens bei nutztierassoziierten MRSA wird auch in anderen europäischen Studien beschrieben (HUIJSDENS et al., 2006; JUHASZ-KASZANYITZKY et al., 2007; VAN DUIJKEREN et al., 2008; VAN DE VIJVER et al., 2014). Weitere Gene, welche für klinische Erkrankungen bedeutend sind, und zwar das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin TSST-1 sowie die Exfoliativen Toxine ETA, ETB und ETD, konnten im Rahmen unserer Studie nicht detektiert werden, was sich ebenfalls in den Daten anderer Autoren widerspiegelt (JUHASZ-KASZANYITZKY et al., 2007; KADLEC et al., 2009; FESSLER et al., 2010; FESSLER et al., 2011; MONECKE et al., 2013)

Insgesamt wiesen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten MRSA-Stämme auf eine nur schwache Ausstattung mit virulenzassoziierten Genen hin, was bereits durch andere Autoren in der Vergangenheit beschrieben wurde (MONECKE et al., 2007; KADLEC et al., 2009; FESSLER et al., 2010; ARGUDIN et al., 2011).

6.5 Anwendbarkeit der *Cfr9I*-Makrorestriktionsanalyse in der MRSA-Typisierung im Vergleich zur MALDI-TOF-MS

Zur Typisierung von Bakterien bzw. zur Feststellung von Unterschieden zwischen ihnen, finden in Routinelaboren grundsätzlich zwei verschiedene Untersuchungsmethoden Anwendung, nämlich die phänotypische und genotypische Charakterisierung von Erregern. Während die Phänotypisierung, Auskunft über das äußere Erscheinungsbild bzw. bestimmte Eigenschaften gibt, kann mittels Genotypisierung eine Analyse der genomischen Struktur des Erregers erfolgen („genetischer Fingerabdruck“). Laut WICHELHAUS et al. (2000) besitzen phänotypische Verfahren wie beispielsweise Bio-, Protein-, Sero- und Phagentypisierung oder Antibiotikaresistenztestung den Nachteil, dass bei Temperatur-, pH-Wert-Änderungen oder Veränderungen des Nährstoffangebots, das Expressionsverhalten und demzufolge auch die Ausprägung des Phänotyps beeinflusst werden kann. Demzufolge haben nach MELLMANN und HARMSEN eine Vielzahl genotypischer bandenbasierter (z.B. Plasmid-Analyse, PFGE, RFLP etc.) bzw. DNA-sequenzbasierter Verfahren (z.B. MLST, Microarray etc.) phänotypische Methoden komplettiert oder mittlerweile ganz und gar ersetzt (MELLMANN & HARMSEN, 2009).

Wie bereits schon mehrfach erwähnt, wurde bis in die jüngste Vergangenheit die Pulsfeldgelelektrophorese als „Goldstandard“ in der Typisierung von Bakterien angesehen (MURCHAN et al., 2003; REED et al., 2007). Neu entwickelte molekularbiologische Techniken, die die Sequenzierung ganzer Genome („whole-genome sequencing“) ermöglichen, haben diese Rolle nun übernommen. Einen weiteren neuartigen Ansatz in der molekularbiologischen Diagnostik bietet das massenspektrometrische Verfahren MALDI-TOF-MS, welches die Bestimmung von Massen von Analyten ermöglicht und in den letzten Jahren sehr erfolgreich in der Proteomforschung zur Identifizierung von Peptiden und Proteinen zum Einsatz kam (SCHUBERT & WIESER, 2010). Laut SCHUBERT und WEIG besitzt das Verfahren, welches auch zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen genutzt wird, auch „prinzipiell das Potenzial, die klassischen biochemischen Differenzierungsverfahren in der mikrobiologischen Diagnostik abzulösen“ (SCHUBERT & WEIG, 2009).

Clusteranalyse mittels MALDI-TOF-MS

Die Methodik der MALDI-TOF-MS weist in der Identifikation von Mikroorganismen, die von Genus- über Spezies bis teilweise sogar zur Subspeziesebene erfolgen kann (KLIEM & SAUER, 2012), eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber anderen Differenzierungsverfahren auf. Diese sind im Einzelnen ein hoher Probendurchsatz bei gleichzeitig niedrigen Kosten für Verbrauchsmaterialien, kurze Analysezeiten sowie eine einfache Handhabung und Automatisierbarkeit bei gleichzeitig hoher Empfindlichkeit und Präzision. Nachteile bleiben aber dennoch, die hohen Kosten, die für Anschaffung und Wartung einkalkuliert werden. Darüber hinaus führt der Abgleich der MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren mit einer im System integrierten Referenzdatenbank dazu, dass nur bereits bekannte Erreger differenziert werden können. Eine starke Erweiterung der Datenbank ist demzufolge erforderlich (ENGELMANN & KUGLER, 2012).

Nach CARBONELLE et al. (2011) basieren die Grundlagen der MALDI-TOF-MS Messung auf drei wesentlichen Faktoren. Zum einen müssen die generierten Proteinprofile, die charakteristisch („molekularer Fingerabdruck“) für die jeweils untersuchten Mikroorganismen sind, sich untereinander unterscheiden. Andererseits müssen die innerhalb der Massenspektren detektierten Proteinpeaks spezifisch für Genus- Spezies- oder auch Subspeziesebene sein und drittens müssen die generierten Spektren reproduzierbar sein (CARBONELLE et al., 2011). Ziel unserer Untersuchung war es, anhand der mittels MALDI-TOF-MS generierten Daten, eine weitere computergestützte Verwandtschaftsanalyse durchzuführen, um epidemiologische Zusammenhänge zwischen ausgewählten MRSA-Isolaten sichtbar zu machen. Der in unserer Studie verwendete relevante Messbereich lag für die einzelnen Proteinpeaks zwischen 2.000 – 20.000 Da, da dieser besonders stabile und aussagekräftige Spektren aufweist.

WELKER & MOORE (2011) berichten, dass zwischen 3.000 – 20.000 Da bei einer Vielzahl der Mikroorganismen zwischen 70 – 200 Proteinpeaks detektiert werden, wovon etwa 50 Peaks, ribosomalen Proteinen zugeordnet werden können (WELKER & MOORE, 2011). Verschiedene Studien belegen, dass die Signale innerhalb der Proteinspektren durch genannte ribosomale Proteine oder auch andere bakterielle Proteine verursacht werden, was wiederum erklärt, warum diese so charakteristisch für die zu untersuchenden Spezies sind und die wesentliche Grundlage der MALDI-TOF-MS Analyse darstellen (SAUER & KLIEM, 2010).

Wie bereits erwähnt, erfolgte in unserer Studie eine aufwendige Extraktion der Proteine gemäß dem standardisierten Protokoll („Ethanol-/Ameisensäure-Extraktion“) der Firma Bruker Daltonik GmbH mit geringfügigen Modifikationen (siehe Punkt 4.2.7). Im Vergleich zur direkten Schmierpräparation kann durch Probenvorbehandlung mittels Proteinextraktion eine Verbesserung des Testergebnisses erreicht werden. Im Detail werden durch den Aufschluss

der Bakterienzelle zelluläre Bestandteile entfernt und Proteine von vorhandenen Verbindungen losgelöst, so dass für die MALDI-TOF-MS Messung mehr Proteine und Peptide angereichert werden. Dementsprechend handelt es sich aber auch um ein wesentlich zeitaufwendigeres Verfahren als es beim direkten Probenauftrag auf die MALDI Targetplatte (Schmierpräparation) der Fall wäre. Im Anschluss daran folgte eine detaillierte Visualisierung und Qualitätsanalyse (mittels FlexAnalysis 3.0 Software) der generierten Proteinspektren. Um mögliche Spektrenvariationen innerhalb und zwischen den einzelnen Messreihen der MALDI-TOF-MS Datenanalyse beurteilen zu können, wurde zusätzlich der CCI mittels MALDI Biotyper Software berechnet. Erst dann wurden von jedem Isolat sechs der insgesamt 27 generierten Massenspektren zufällig ausgewählt und die finale Clusteranalyse durchgeführt.

Die Fragen, die wir letztlich mittels MALDI-TOF-MS Messung beantworten wollten, lauteten dabei wie folgt: „Zeigt der direkte Vergleich der generierten Dendrogramme aus den parallel durchgeführten Clusteranalysen (Makrorestriktionsanalyse, MALDI-TOF-MS) ein übereinstimmendes Ergebnis?“, und wenn ja, „Kann die MALDI-TOF-MS als Methode zur Ermittlung von epidemiologischen Zusammenhängen zukünftig Einsatz finden?“

Vergleich der generierten Dendrogramme aus der Makrorestriktionsanalyse bzw. MALDI-TOF-MS Messung

Grundlegend handelt es sich bei der Makrorestriktionsanalyse bzw. der MALDI-TOF-MS um zwei sehr unterschiedliche Methoden zur Typisierung von Bakterienstämmen. Während bei der Makrorestriktionsanalyse durch Separierung des Genoms in DNA-Fragmente charakteristische Restriktionsprofile zur Analyse des bakteriellen Genoms generiert werden, die eine genetische Verwandtschaftsanalyse zwischen den Isolaten einer Spezies ermöglichen, wird mittels MALDI-TOF-MS ein charakteristisches Massenspektrum des gesamten bakteriellen Proteoms der Bakterienprobe durch Bestimmung der Flugzeit der einzelnen Analyte ermittelt. Demzufolge stehen sich zwei unterschiedliche Untersuchungsverfahren gegenüber, auch wenn die abschließende Auswertung der Ähnlichkeitsanalysen anhand identischer Parameter erfolgte.

Für die Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS fand eine besonders aufwendige Präparations- sowie Messtechnik Anwendung. Im Ergebnis wurden von den 34 ausgewählten MRSA-Stämmen, insgesamt 204 Massenspektren im Zuge der PAST-Analyse miteinander verglichen. Die enorme Auflösungskraft der MALDI-TOF-MS spiegelt sich in dem Dendrogramm in Abbildung 15 wider. Doch wird hier vor allem die biologische sowie technische Variabilität verdeutlicht, so dass eine Interpretation von epidemiologischen Zusammenhängen zwischen den einzelnen Isolaten nicht erfolgen konnte, auch nicht mit dem festgesetzten Grenzwert von 0,74.

Infolgedessen musste eine Wiederholung der Verwandtschaftsanalyse der MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren erfolgen. Im Detail wurde dabei von jedem Isolat immer nur das erste der 27 Massenspektren ausgewählt, so dass letztlich 34 Massenspektren im Zuge der wiederholten PAST-Analyse miteinander verglichen wurden.

Die anschließende Gegenüberstellung der beiden parallel durchgeführten Clusteranalysen (Makrorestriktionsanalyse, MALDI-TOF-MS) zeigte hinsichtlich der aufgezeigten Verwandtschaftsverhältnisse keine übereinstimmenden Ergebnisse. So war beispielsweise zu erwarten, dass MRSA-Isolate mit einer hundertprozentigen Übereinstimmung in der Verwandtschaftsanalyse wie 19, 30 und 32 (siehe Abbildung 17, PFGE-Cluster V) oder 29 und 34 (siehe Abbildung 17, PFGE-Cluster II), auch als ähnlich in der Clusteranalyse mittels PAST-Software eingestuft werden können, was jedoch nicht der Fall war.

Besonders auffällig waren andererseits die Spektren der Isolate 24 und 14, die im Unterschied zur Clusteranalyse der mittels PFGE generierten Makrorestriktionsmuster jeweils ein völlig eigenständiges MALDI-Cluster ausbildeten (siehe Abbildung 16).

Die hochauflösende MALDI-TOF-MS kann nach jetzigem Wissenstand demnach nicht als Alternativmethode zur Makrorestriktionsanalyse und für epidemiologische Untersuchungen von MRSA empfohlen werden. Jedoch erweist sich die MALDI-TOF-MS als Verfahren mit einer extrem hohen Auflösungskraft und durch Optimierung der Auswertungsalgorithmen erscheint eine reproduzierbare, vergleichende Analyse hoch abundant exprimierter ribosomaler Proteine zum Vergleich von Bakterien einer Bakterienspezies möglich. Hierbei kann es sich aber nicht um eine Verwandtschaftsanalyse, sondern vielmehr z.B. um ein sehr kostengünstiges Vorscreening für die weitergehenden genetischen Untersuchungen handeln.

Nachdem sich die MALDI-TOF-MS in den vergangenen Jahren in der Differenzierung von Bakterien und Pilzen gegen konventionelle Methoden durchsetzen konnte, wurden nun auch erste Schritte unternommen, die Methode zur schnellen Resistenzbestimmung von Bakterien und Pilzen zu nutzen (SCHUBERT & KOSTRZEWA, 2017). So wurde vor kurzem gezeigt, dass die MALDI-TOF-MS in der Detektion von Resistenzen gegen β -Lactam Antibiotika eingesetzt werden kann. Im Detail erfolgt eine Inkubation des gram-negativen Bakteriums mit dem Antibiotikum. In Anwesenheit einer β -Lactamase kommt es zur Spaltung des β -Lactamrings des Antibiotikums. Durch die Hydrolyse entstehen nun neue Proteinpeaks, die in anderen Massenbereichen MALDI-TOF-MS detektiert werden können (JUNG et al., 2014). Ein anderer Ansatz beruht darauf den Erreger in einem Medium zu inkubieren, das eine mit stabilen Isotopen markierte Aminosäure enthält. Der dadurch bedingte Anstieg der Proteinmassen führt zu einer nachweisbaren Massenverschiebung der Protein-Peaks (SPARBIER et al., 2013).

7 Zusammenfassung

Vergleichende epidemiologische und molekularbiologische Untersuchung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) aus Nutztierhaltungen und deren Umgebung

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die weiterführende Untersuchung von ausgewählten Proben, die im Zuge eines Teilprojektes zwischen der Freien Universität Berlin und der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur Erfüllung eines Entscheidungshilfebedarfs des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz von 2009 – 2011 isoliert wurden. Ziel des Teilprojektes war es, das Vorkommen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in der Stallluft und Abluft von Tierhaltungen verschiedener Tierarten zu untersuchen. Um ein entsprechendes Übertragungsrisiko luftgetragener MRSA aus Nutztierställen auf andere Tierbestände oder Anwohner in der Umgebung einschätzen zu können, wurden Feldstudien in konventionellen Schweine- und Geflügelbetrieben durchgeführt.

Mittels molekularbiologischer Analyseverfahren sollte im Rahmen dieser Dissertation dann der aerogene Austrag von MRSA aus dem Tierstall in die direkte Stallumgebung eindeutig belegt sowie eine differenzierte Beurteilung bezüglich der Tenazität und Pathogenität emittierter und deponierter MRSA getroffen werden. Zusätzlich hierzu erfolgte eine vergleichende Evaluierung generierter Daten aus MALDI-TOF-MS und Makrorestriktionsanalysen, um diese beiden Typisierungsmethoden hinsichtlich ihrer diagnostischen Diversität bzw. Gleichwertigkeit beurteilen zu können.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Insgesamt wurden 238 ausgewählte MRSA-Isolate, die aus vier Schweinemast- und zwei Schweinezuchtbeständen sowie aus zwei Masthähnchen- und vier Putenmastbeständen stammten, weiterführend charakterisiert. Die *spa*-Typisierung zeigte, dass im Innen- sowie Außenbereich der jeweiligen Schweinebestände die *spa*-Typen t011, t108 und t1451 dominierten, wohingegen in den Putenmastbeständen t011, t5452 und t034 bzw. in den Masthähnchenbeständen t1430 am häufigsten innen und außen nachgewiesen wurden. Während die Mehrzahl der Isolate (87%) dem klonalen Komplex CC398 zugeordnet wurde, gehörten alle übrigen sogenannten Non-CC398 MRSA-Stämme (13%) den Sequenztypen ST9 bzw. ST5 an.

Das Vorkommen von identischen *spa*-Typen im Innen- und Außenbereich der Nutztierhaltungen untermauert die bereits früher in diesem Projekt getroffene Annahme, dass eine luftgetragene Verbreitung von MRSA in die Umwelt stattgefunden haben könnte.

Für die klonale Verwandtschaftsanalyse mittels *Cfr9I*-Makrorestriktionsanalyse und anschließender Pulsfeldgelelektrophorese wurden insgesamt 124 MRSA-Isolate, davon 60 aus Schweine-, 34 aus Masthähnchen- sowie 30 aus Putenmastbeständen ausgewählt.

Die Analyse zeigte, dass in allen untersuchten Beständen identische MRSA-Klone sowohl im Innen- als auch im Außenbereich vorkamen und sogar in Luftproben aus dem Tierstall bzw. der Stallumgebung bis zu einer Entfernung von 50 m bzw. 150 m auf der windabgewandten Seite nachgewiesen wurden. Da die Luftprobenahmen stets zeitsimultan erfolgten, kann hier von einer nachgewiesenen aerogenen Emission von MRSA aus dem Tierstall in die direkte Stallumgebung ausgegangen werden.

Für die Gegenüberstellung von emittierten und deponierter MRSA unter wechselnden Umweltbedingungen, wurden in den Schweinebeständen zusätzlich Isolate aus der Winter und Sommerprobenahme miteinander verglichen. So gelang beispielsweise der Nachweis von identischen MRSA-Klonen in identischen Entfernung im Winter sowie im darauffolgenden Sommer. Die Erkenntnis, dass der Erreger über mehrere Monate in der Umwelt überdauert haben muss, bekräftigt die Annahme aus der Vorgängerstudie bezüglich einer erheblichen Umwelttenazität.

Die Genexpressionsanalyse von ausgewählten Isolaten (n=38) mittels eines *S. aureus* spezifischen DNA-Microarrays wies letztlich auf eine nur schwache Ausstattung der MRSA-Stämme mit virulenzassoziierten Genen hin. Im Detail wurde bei allen untersuchten MRSA-Stämmen das Methicillin-Resistenzgen *mecA* sowie das Penicillin-Resistenz vermittelnde β -Lactamase-Gen *blaZ* nachgewiesen. Darüberhinaus traten auch weitere Antibiotikaresistenzgene regelmäßig auf. Das Panton-Valentine Leukozidin-Gen sowie das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-Gen konnte bei keinem der untersuchten MRSA-positiven Stämme detektiert werden. Darüber hinaus ließen sich bei allen Isolaten, Biofilm-assoziierte Gene nachweisen. 31,6 % zeigten sogar eine mögliche Fähigkeit zur Bildung von sogenannten Staphylokokken-Enterotoxinen (SE). Jedoch bedeutet die Detektion entsprechender Gene mittels Microarray-Technologie nicht unweigerlich, dass diese auch zur Expression gelangen müssen und folglich ein krankmachendes Potential für Mensch und Tier besitzen.

Abschließend erfolgte die Gegenüberstellung der Daten aus MALDI-TOF-MS und Makrorestriktionsanalyse, wobei der direkte Vergleich der generierten Clusteranalysen zu keinem einheitlichen Ergebnis führte. Während sie zur Spezies- und Subspeziesidentifikation ausgezeichnet geeignet ist, kann die MALDI-TOF-MS-Analyse nach aktuellem Entwicklungsstand nicht zur MRSA-Feintypisierung für epidemiologische Fragestellungen empfohlen werden. Weiterführende Untersuchungen erscheinen diesbezüglich jedoch erforderlich und sinnvoll.

8 Summary

Comparative epidemiological and molecular biological analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from livestock and its environment

Within the scope of this present study, selected samples which were isolated in the course of a partial project between the Free University Berlin and the Veterinary University Hannover from 2009 to 2011, have been further investigated. The objective of that previous study was to comprehensively determine the occurrence of MRSA in barn air and housing environment in animal husbandries of different animal species in Germany. To estimate an appropriate transfer risk of airborne MRSA from livestock to other animal populations or local residents, field studies have been performed in conventional pig and poultry farms.

Within the following thesis the emission of MRSA from barn air to the vicinity of the farms should be proven by using molecular biological analysis. Furthermore, a differentiated evaluation regarding to the tenacity and pathogenicity of transmitted and sedimented MRSA should be performed. Finally, results of macrorestriction analysis were compared to an approach of using protein spectra obtained by MALDI-TOF-MS for molecular epidemiology.

Overall 238 selected MRSA isolates originating from four fattening pig farms and two breeding pig farms as well as two broiler and four turkey fattening farms were further investigated. The *spa*-typing demonstrated that in pig barns and its environment the *spa*-types t011, t108 and t1451 were identified most frequently, whereas t011, t5452 and t034 dominated in the inside and outside of the turkey farms respectively t1430 in the broiler farms. The majority of the selected isolates (87%) were assigned to clonal complex 398. All so-called non-CC398 strains (13%) were assigned to sequence type ST9 or ST5. A simultaneous detection of the same MRSA *spa* types inside the barns and within the whole farm confirmed the hypothesis of the previous study that an emission via the airborne route has been occurred.

The clonal analysis was performed by Cfr9I pulsed-field gel electrophoresis. Therefore 124 MRSA isolates (60 from pig farms, 34 from broiler farms and 30 from turkey farms) were chosen. The results demonstrated the presence of MRSA clones in the barn air and housing environment of investigated animal husbandries. In addition, MRSA clones could also be detected in air samples from inside as well as from outside on the downwind site up to a distance to 50m and 150m, respectively. Because air sampling was performed simultaneously we can assume a proven airborne transmission of MRSA from livestock.

In order to compare transmitted and sedimented MRSA under changing environmental conditions, pig isolates from summer and winter samplings were investigated. As a result, MRSA clones were detected in samples from winter and the following summer at identical distances. This confirms the hypothesis of the previous study that sedimented MRSA strains show high tenacity in the environment by surviving longer periods on soil surfaces.

Additionally, a series of 38 samples were selected for microarray analysis. Investigated MRSA strains displayed only a low presence of virulence associated genes. Resistance genes for beta-lactam antimicrobials were detected in all isolates. Genes mediating resistance to other antimicrobial classes were also frequently detected. Furthermore, the Panton-Valentine Leukozidin gene and the Toxic Shock Syndrome Toxin gene could not be identified in any of the positive MRSA strains. While all investigated MRSA strains might be able to form bacterial biofilms, genes for staphylococcal enterotoxins were found in only 31,6 % of the investigated isolates. However, the detection of antibiotic resistance genes or genes encoding for SE does not mean that appropriate genes will be expressed and own a pathogenic potential for humans and animals

Finally protein mass spectra obtained by MALDI-TOF-MS and macrorestriction analysis were compared with each other in regard of their usability for molecular epidemiology. Phylogenetics on the basis of PFGE analysis is widely accepted. Cluster analysis of protein spectra differed substantially from the widely PFGE ones. For this reason using MALDI-TOF-MS for typing MRSA for epidemiology purpose is not recommended yet. However, further investigations on this topic seem to be necessary and useful.

9 Literaturverzeichnis

- AANENSEN, D. M., SPRATT, B. G., 2005.
The multilocus sequence typing network: mlst.net.
Nucleic Acids Res. 33: 728-733.
- AGERSO, Y., HASMAN, H., CAVACO, L. M., PEDERSEN, K., AARESTRUP, F. M., 2012.
Study of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Danish pigs at slaughter and in imported retail meat reveals a novel MRSA type in slaughter pigs.
Vet Microbiol. 157: 246-250.
- ALT, K., FETSCH, A., SCHROETER, A., GUERRA, B., HAMMERL, J. A., HERTWIG, S., SENKOV, N., GEINETS, A., MUELLER-GRAF, C., BRAEUNIG, J., KAESBOHRER, A., APPEL, B., HENSEL, A., TENHAGEN, B. A., 2011.
Factors associated with the occurrence of MRSA CC398 in herds of fattening pigs in Germany.
BMC Vet Res. 7: 69.
- ARGUDIN, M. A., MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R., 2010a.
Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins.
Toxins (Basel). 2: 1751-1773.
- ARGUDIN, M. A., RODICIO, M. R., GUERRA, B., 2010b.
The emerging methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 clone can easily be typed using the Cfr9I Smal-neoschizomer.
Lett Appl Microbiol. 50: 127-130.
- ARGUDIN, M. A., TENHAGEN, B. A., FETSCH, A., SACHSENROEDER, J., KAESBOHRER, A., SCHROETER, A., HAMMERL, J. A., HERTWIG, S., HELMUTH, R., BRAEUNIG, J., 2011.
Virulence and Resistance Determinants of German Staphylococcus aureus ST398 Isolates from Nonhuman Sources.
Appl Environ Microbiol. 77: 3052-3060.
- ARNOLD, R. J., REILLY, J. P., 1998.
Fingerprint matching of E. coli strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach.
Rapid Commun Mass Spectrom. 12: 630-636.
- ASPIROZ, C., LOZANO, C., VINDEL, A., LASARTE, J. J., ZARAZAGA, M., TORRES, C., 2010.
Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain.
Emerg Infect Dis. 16: 157-159.
- BECKER, K., BÜRCK, C., MÄRTLBAUER, E., 2007.
Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis.
J Verbrauch Lebensm. 2: 171-189.

- BECKER, K., LARSEN, A. R., SKOV, R. L., PATERSON, G. K., HOLMES, M. A., SABAT, A. J., FRIEDRICH, A. W., KOCK, R., PETERS, G., KRIEGESKORTE, A., 2013.
Evaluation of a modular multiplex-PCR methicillin-resistant Staphylococcus aureus detection assay adapted for mecC detection.
J Clin Microbiol. 51: 1917-1919.
- BECKER, K., PAGNIER, I., SCHUHEN, B., WENZELBURGER, F., FRIEDRICH, A. W., KIPP, F., PETERS, G., VON EIFF, C., 2006.
Does nasal cocolonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant S. aureus determinations by molecular methods?
J Clin Microbiol. 44: 229-231.
- BECKER, K., PETERS, G., 2009.
„Staphylococcaceae“, Micrococcaceae und Dermacoccaceae.
In: B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, & P. Kimmig.
Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie,
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 2. Auflage: 333-351.
- BECKER, K., SKOV, R. L., EIFF, C. V., 2015.
Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci.
In: J. H. Jorgensen & M. A. Pfaller.
Manual of Clinical Microbiology,
ASM Press, 11. Auflage: 354-382.
- BENS, C. C., VOSS, A., KLAASSEN, C. H., 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.
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR). 2009a.
Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2009.
https://mobil.bfr.bund.de/cm/350/erreger_von_zoonosen_in_deutschland_im_jahr_2009.pdf.
Abrufdatum: 24.09.2018.
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) 2009b.
Menschen können sich über den Kontakt mit Nutztieren mit Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus (MRSA) infizieren
Stellungnahme Nr. 014/2009 des BfR vom 15. März 2009.
https://www.bfr.bund.de/cm/343/menschen_koennen_sich_ueber_den_kontakt_mit_nutztieren_mit_mrsa_infizieren.pdf
Abrufdatum: 24.09.2018.

- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR). 2016.
Ausbruchsaufklärung entlang der Lebensmittelkette. Leitfaden einer Bund-Länder Arbeitsgruppe.
<https://www.bfr.bund.de/cm/343/ausbruchsaufklaerung-entlang-der-lebensmittelkette.pdf>
Abrufdatum: 24.09.2018.
- BOSCH, T., DE NEELING, A. J., SCHOOLS, L. M., VAN DER ZWALUW, K. W., KLUYTMANS, J. A., GRUNDMANN, H., HUIJSDENS, X. W., 2010.
PFGE diversity within the methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonal lineage ST398.
BMC Microbiol. 10: 40.
- BUMGARNER, R., 2013.
Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future.
Curr Protoc Mol Biol. Chapter 22:Unit 22.
- CARBONNELLE, E., MESQUITA, C., BILLE, E., DAY, N., DAUPHIN, B., BERETTI, J. L., FERRONI, A., GUTMANN, L., NASSIF, X., 2011.
MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory.
Clin Biochem. 44: 104-109.
- CARRICO, J. A., PINTO, F. R., SIMAS, C., NUNES, S., SOUSA, N. G., FRAZAO, N., DE LENCASTRE, H., ALMEIDA, J. S., 2005.
Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis.
J Clin Microbiol. 43: 5483-5490.
- CHANG, S., SIEVERT, D. M., HAGEMAN, J. C., BOULTON, M. L., TENOVER, F. C., DOWNES, F. P., SHAH, S., RUDRIK, J. T., PUPP, G. R., BROWN, W. J., CARDO, D., FRIDKIN, S. K., 2003.
Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene.
N Engl J Med. 348: 1342-1347.
- CHAPIN, A., RULE, A., GIBSON, K., BUCKLEY, T., SCHWAB, K., 2005.
Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation.
Environ Health Perspect. 113: 137-142.
- CHOPRA, I., ROBERTS, M., 2001.
Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance.
Microbiol Mol Biol Rev. 65: 232-260.

- CLARKE, S. R., FOSTER, S. J., 2006.
Surface adhesins of Staphylococcus aureus.
Adv Microb Physiol. 51: 187-224.
- CLAYDON, M. A., DAVEY, S. N., EDWARDS-JONES, V., GORDON, D. B., 1996.
The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry.
Nat Biotechnol. 14: 1584-1586.
- CUNY, C., KÖCK, R., WITTE, W., 2013.
Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany.
Int J Med Microbiol. 303: 331-337.
- CUNY, C., LAYER, F., STROMMENDER, B., WITTE, W., 2011.
Rare occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC130 with a novel mecA homologue in humans in Germany.
PLoS One. 6: e24360. doi: 10.1371/journal.pone.0024360.
- CUNY, C., NATHAUS, R., LAYER, F., STROMMENDER, B., ALTMANN, D., WITTE, W., 2009.
Nasal colonization of humans with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs.
PLoS One. 4: e6800. doi: 10.1371/journal.pone.0006800.
- DAHMS, C., HUBNER, N. O., CUNY, C., KRAMER, A., 2014.
Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in farm workers and the livestock environment in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany.
Acta Vet Scand. 56: 53.
- DE NEELING, A. J., VAN DEN BROEK, M. J., SPALBURG, E. C., VAN SANTEN-VERHEUVEL, M. G., DAM-DEISZ, W. D., BOSHUIZEN, H. C., VAN DE GIESSEN, A. W., VAN DUIJKEREN, E., HUIJSDENS, X. W., 2007.
High prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aureus in pigs.
Vet Microbiol. 122: 366-372.
- DEURENBERG, R. H., STOBBERINGH, E. E., 2008.
The evolution of Staphylococcus aureus.
Infect Genet Evol. 8: 747-763.
- DEVRIESE, L. A., VAN DAMME, L. R., FAMEREE, L., 1972.
Methicillin (cloxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis cases.
Zentralbl Veterinarmed B. 19: 598-605.
- DIEDEREN, B., VAN DUIJN, I., VAN BELKUM, A., WILLEMSE, P., VAN KEULEN, P., KLUYTMANS, J., 2005.
Performance of CHROMagar MRSA medium for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.
J Clin Microbiol. 43: 1925-1927.

- DIERIKX, C. M., HENGEVELD, P. D., VELDMAN, K. T., DE HAAN, A., VAN DER VOORDE, S., DOP, P. Y., BOSCH, T., VAN DUIJKEREN, E., 2016.
Ten years later: still a high prevalence of MRSA in slaughter pigs despite a significant reduction in antimicrobial usage in pigs the Netherlands.
J Antimicrob Chemother. 71: 2414-2418.
- DINGES, M. M., ORWIN, P. M., SCHLIEVERT, P. M., 2000.
Exotoxins of Staphylococcus aureus.
Clin Microbiol Rev. 13: 16-34.
- DOUTHWAITE, S., CHAMPNEY, W. S., 2001.
Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site.
J Antimicrob Chemother. 48: 1-8.
- DULLWEBER, A., 2010.
Untersuchungen zum Vorkommen von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus (MRSA) in Geflügelmastbeständen.
Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA, ECDC) 2015.
EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013.
EFSA J. 13. 13: 1-178.
- ENGELMANN, E., KUGLER, F., 2012.
MALDI-TOF Massenspektrometrie Eine molekulare Identifizierungsmethode im GMP-Umfeld.
TechnoPharm. 1: 1-5.
- ENRIGHT, M. C., DAY, N. P., DAVIES, C. E., PEACOCK, S. J., SPRATT, B. G., 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., ROBINSON, D. A., RANDLE, G., FEIL, E. J., GRUNDMANN, H., SPRATT, B. G., 2002.
The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).
Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 7687-7692.
- ETTEL, A., 2015.
"Antibiotika-Resistenz – die Superseuche der Zukunft".
<https://www.welt.de/wirtschaft/article142110146/Antibiotika-Resistenz-die-Superseuche-der-Zukunft.html>
Abrufdatum: 24.09.2018.

- FELTENS, R., GORNER, R., KALKHOF, S., GROGER-ARNDT, H., VON BERGEN, M., 2010.
Discrimination of different species from the genus Drosophila by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry.
BMC Evol Biol. 10: 95.
- FESSLER, A., SCOTT, C., KADLEC, K., EHRLICH, R., MONECKE, S., SCHWARZ, S., 2010.
Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from cases of bovine mastitis.
J Antimicrob Chemother. 65: 619-625.
- FESSLER, A. T., KADLEC, K., HASSEL, M., HAUSCHILD, T., EIDAM, C., EHRLICH, R., MONECKE, S., SCHWARZ, S., 2011.
Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from food and food products of poultry origin in Germany.
Appl Environ Microbiol. 77: 7151-7157.
- FLAYHART, D., HINDLER, J. F., BRUCKNER, D. A., HALL, G., SHRESTHA, R. K., VOGEL, S. A., RICHTER, S. S., HOWARD, W., WALTHER, R., CARROLL, K. C., 2005.
Multicenter evaluation of BBL CHROMagar MRSA medium for direct detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from surveillance cultures of the anterior nares.
J Clin Microbiol. 43: 5536-5540.
- FOSTER, T. J., 2002.
Staphylococcus aureus.
In: M. Sussman.
Molecular Medical Microbiology,
Academic Press, 1. Auflage: 839-888.
- FOSTER, T. J., GEOGHEGAN, J. A., GANESH, V. K., HOOK, M., 2014.
Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus.
Nat Rev Microbiol. 12: 49-62.
- FRENAY, H. M., BUNSCHOTEN, A. E., SCHOOLS, L. M., VAN LEEUWEN, W. J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M., VERHOEF, J., MOOI, F. R., 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.
- FRIEDRICH, A. W., 2009.
Vernetzter Kampf gegen MRSA.
<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=29463>
Abrufdatum: 24.09.2018.

- FRIEDRICH, A. W., WITTE, W., DE LENCASTRE, H., HRYNIEWICZ, W., SCHERES, J., WESTH, H., 2008.
A European laboratory network for sequence-based typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) as a communication platform between human and veterinary medicine--an update on SeqNet.org.
Euro Surveill. 13: 1-5.
- FRIESE, A., SCHULZ, J., HOEHLE, L., FETSCH, A., TENHAGEN, B. A., HARTUNG, J., ROESLER, U., 2012.
Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns.
Vet Microbiol. 158: 129-135.
- FRIESE, A., SCHULZ, J., ZIMMERMANN, K., TENHAGEN, B. A., FETSCH, A., HARTUNG, J., ROESLER, U., 2013.
Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity.
Appl Environ Microbiol. 79: 2759-2766.
- FUDA, C. C., FISHER, J. F., MOBASHERY, S., 2005.
Beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus: the adaptive resistance of a plastic genome.
Cell Mol Life Sci. 62: 2617-2633.
- GAILLOT, O., WETSCH, M., FORTINEAU, N., BERCHE, P., 2000.
Evaluation of CHROMagar Staph. aureus, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of Staphylococcus aureus from human clinical specimens.
J Clin Microbiol. 38: 1587-1591.
- GARCIA-ALVAREZ, L., HOLDEN, M. T., LINDSAY, H., WEBB, C. R., BROWN, D. F., CURRAN, M. D., WALPOLE, E., BROOKS, K., PICKARD, D. J., TEALE, C., PARKHILL, J., BENTLEY, S. D., EDWARDS, G. F., GIRVAN, E. K., KEARNS, A. M., PICHON, B., HILL, R. L., LARSEN, A. R., SKOV, R. L., PEACOCK, S. J., MASKELL, D. J., HOLMES, M. A., 2011.
Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study.
Lancet Infect Dis. 11: 595-603.
- GARDNER, I. A., WILLEBERG, P., MOUSING, J., 2002.
Empirical and theoretical evidence for herd size as a risk factor for swine diseases.
Anim Health Res Rev. 3: 43-55.
- GATERMANN, S., 2016.
Staphylokokken.
In: S. Suerbaum, G.-D. Burchard, S. H. E. Kaufmann, & T. F. S. (Hrsg.).
Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie,
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 8. Auflage: 187-196.

- GEENEN, P. L., GRAAT, E. A., HAENEN, A., HENGEVELD, P. D., VAN HOEK, A. H., HUIJSDENS, X. W., KAPPERT, C. C., LAMMERS, G. A., VAN DUIJKEREN, E., VAN DE GIESSEN, A. W., 2013.
Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms.
Epidemiol Infect. 141: 1099-1108.
- GEISEL, R., SCHMITZ, F.-J., 2003.
Resistenzphänotypen und -genotypen bei Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus-Isolaten. Teil II: Oxazolidinone, Mupirocin, Tetracycline, Rifampicin, Fusidinsäure und Co-trimoxazol.
Chemother. J. 6: 68 - 173.
- GIBBS, S. G., GREEN, C. F., TARWATER, P. M., MOTA, L. C., MENA, K. D., SCARPINO, P. V., 2006.
Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation.
Environ Health Perspect. 114: 1032-1037.
- GILCHRIST, C. A., TURNER, S. D., RILEY, M. F., PETRI, W. A., JR., HEWLETT, E. L., 2015.
Whole-genome sequencing in outbreak analysis.
Clin Microbiol Rev. 28: 541-563.
- GRAVELAND, H., WAGENAAR, J. A., HEESTERBEEK, H., MEVIUS, D., VAN DUIJKEREN, E., HEEDERIK, D., 2010.
Methicillin resistant Staphylococcus aureus ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene.
PLoS One. 5: e10990. doi: 10.1371/journal.pone.0010990.
- GREEN, C. F., GIBBS, S. G., TARWATER, P. M., MOTA, L. C., SCARPINO, P. V., 2006.
Bacterial plume emanating from the air surrounding swine confinement operations.
J Occup Environ Hyg. 3: 9-15.
- GROß, U., 2013.
Systematik der Bakterien.
In: U. Groß.
Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie,
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 3. Auflage: 44-49.
- GUARDABASSI, L., STEGGER, M., SKOV, R., 2007.
Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus ST398 in Danish slaughter pigs.
Vet Microbiol. 122: 384-386.

- HARMSSEN, D., CLAUS, H., WITTE, W., ROTHGANGER, J., CLAUS, H., TURNWALD, D., VOGEL, U., 2003.
Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management.
J Clin Microbiol. 41: 5442-5448.
- HEILMANN, C., GERKE, C., PERDREAU-REMGTON, F., GOTZ, F., 1996.
Characterization of Tn917 insertion mutants of Staphylococcus epidermidis affected in biofilm formation.
Infect Immun. 64: 277-282.
- HEISIG, P., 2006.
Wirkungs- und Resistenzmechanismen der β -Lactam-Antibiotika: Penicillin-bindende Proteine, β -Lactamasen und Signalproteine.
Pharm Unserer Zeit. 35: 400-408.
- HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M., ITO, T., 2001.
The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.
Trends Microbiol. 9: 486-493.
- HIRAMATSU, K., HANAOKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TENOVER, F. C., 1997.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility.
J Antimicrob Chemother. 40: 135-136.
- HIRAMATSU, K., KATAYAMA, Y., YUZAWA, H., ITO, T., 2002.
Molecular genetics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.
Int J Med Microbiol. 292: 67-74.
- HOWDEN, B. P., DAVIES, J. K., JOHNSON, P. D., STINEAR, T. P., GRAYSON, M. L., 2010.
Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications.
Clin Microbiol Rev. 23: 99-139.
- HUIJSDENS, X. W., VAN DIJKE, B. J., SPALBURG, E., VAN SANTEN-VERHEUVEL, M. G., HECK, M. E., PLUISTER, G. N., VOSS, A., WANNET, W. J., DE NEELING, A. J., 2006.
Community-acquired MRSA and pig-farming.
Ann Clin Microbiol Antimicrob. 5: 26.
- HULETSKY, A., GIROUX, R., ROSSBACH, V., GAGNON, M., VAILLANCOURT, M., BERNIER, M., GAGNON, F., TRUCHON, K., BASTIEN, M., PICARD, F. J., VAN BELKUM, A., OUELLETTE, M., ROY, P. H., BERGERON, M. G., 2004.
New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from specimens containing a mixture of staphylococci.
J Clin Microbiol. 42: 1875-1884.

- HUMMEL, R., TSCHAPE, H., WITTE, W., 1986.
Spread of plasmid-mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry.
J Basic Microbiol. 26: 461-466.
- ITO, T., KUWAHARA-ARAI, K., KATAYAMA, Y., UEHARA, Y., HAN, X., KONDO, Y., HIRAMATSU, K., 2014.
Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) analysis of MRSA.
Methods Mol Biol. 1085: 131-148.
- JEVONS, M. P., 1961.
"Celbenin" - resistant Staphylococci.
Br Med J. 1(5219): 124-125.
- JUHASZ-KASZANYITZKY, E., JANOSI, S., SOMOGYI, P., DAN, A., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L., VAN DUIJKEREN, E., WAGENAAR, J. A., 2007.
MRSA transmission between cows and humans.
Emerg Infect Dis. 13: 630-632.
- JUNG, J. S., POPP, C., SPARBIER, K., LANGE, C., KOSTRZEWA, M., SCHUBERT, S., 2014.
Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of beta-lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures.
J Clin Microbiol. 52: 924-930.
- KADLEC, K., EHRLICH, R., MONECKE, S., STEINACKER, U., KASPAR, H., MANKERTZ, J., SCHWARZ, S., 2009.
Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from diseased swine.
J Antimicrob Chemother. 64: 1156-1164.
- KAHL, B. C., MELLMANN, A., DEIWICK, S., PETERS, G., HARMSSEN, D., 2005.
Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in Staphylococcus aureus.
J Clin Microbiol. 43: 502-505.
- KARAS, M., HILLENKAMP, F., 1988.
Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.
Anal Chem. 60: 2299-2301.
- KEHRENBURG, C., SCHWARZ, S., JACOBSEN, L., HANSEN, L. H., VESTER, B., 2005.
A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503.
Mol Microbiol. 57: 1064-1073.

- KHANNA, T., FRIENDSHIP, R., DEWEY, C., WEESE, J. S., 2008.
Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers.
Vet Microbiol. 128: 298-303.
- KLIEM, M., SAUER, S., 2012.
The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics.
Curr Opin Microbiol. 15: 397-402.
- KLOTZ, M., ZIMMERMANN, S., OPPER, S., HEEG, K., MUTTERS, R., 2005.
Possible risk for re-colonization with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) by faecal transmission.
Int J Hyg Environ Health. 208: 401-405.
- KÖCK, R., HARLIZIUS, J., BRESSAN, N., LAERBERG, R., WIELER, L. H., WITTE, W., DEURENBERG, R. H., VOSS, A., BECKER, K., FRIEDRICH, A. W., 2009.
Prevalence and molecular characteristics 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.
- KÖCK, R., MELLMANN, A., SCHAUMBURG, F., FRIEDRICH, A. W., KIPP, F., BECKER, K., 2011.
Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus in Deutschland.
Dtsch Arztebl. 108: 761-766.
- KOKARE, C. R., CHAKRABORTY, S., KHOPADE, A. N., MAHADIK, K. R., 2009.
Biofilm: Importance and applications.
Indian J Biotechnol. 8: 159-168.
- KONDO, Y., ITO, T., MA, X. X., WATANABE, S., KREISWIRTH, B. N., ETIENNE, J., HIRAMATSU, K., 2007.
Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions.
Antimicrob Agents Chemother. 51: 264-274.
- KRIEGESKORTE, A., BALLHAUSEN, B., IDELEVICH, E. A., KOCK, R., FRIEDRICH, A. W., KARCH, H., PETERS, G., BECKER, K., 2012.
Human MRSA isolates with novel genetic homolog, Germany.
Emerg Infect Dis. 18: 1016-1018.
- LAMBERT, P. A., ALLISON, D. G., GILBERT, P., 2002.
Antibiotics that Act on the Cell Wall and Membrane.
In: M. Sussman.
Molecular Medical Microbiology,
Academic Press, 1. Auflage: 591-598.

- 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.
- LIM, D., STRYNADKA, N. C., 2002.
Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant Staphylococcus aureus.
Nat Struct Biol. 9: 870-876.
- LIM, S. K., NAM, H. M., JANG, G. C., LEE, H. S., JUNG, S. C., KIM, T. S., 2013.
Transmission and persistence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in milk, environment, and workers in dairy cattle farms.
Foodborne Pathog Dis. 10: 731-736.
- LIM, S. K., NAM, H. M., JANG, G. C., LEE, H. S., JUNG, S. C., KWAK, H. S., 2012.
The first detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in pigs in Korea.
Vet Microbiol. 155: 88-92.
- LINA, G., PIEMONT, Y., GODAIL-GAMOT, F., BES, M., PETER, M. O., GAUDUCHON, V., VANDENESCH, F., ETIENNE, J., 1999.
Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia.
Clin Infect Dis. 29: 1128-1132.
- LINDE, H.-J., LEHN, N., 2006.
 β -Lactam-Resistenz „trifft“ Virulenz Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus.
Pharm Unserer Zeit. 5: 422-425.
- LONCARIC, I., KUNZEL, F., 2013.
Sequence type 398 methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in a pet rabbit.
Vet Dermatol. 24: 370-372
- LONG, K. S., POEHLGAARD, J., KEHRENBURG, C., SCHWARZ, S., VESTER, B., 2006.
The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicolis, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 50: 2500-2505.
- LYON, B. R., SKURRAY, R., 1987.
Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis.
Microbiol Rev. 51: 88-134.

- MALHOTRA-KUMAR, S., ABRAHANTES, J. C., SABIITI, W., LAMMENS, C., VERCAUTEREN, G., IEVEN, M., MOLENBERGHS, G., AERTS, M., GOOSSENS, H., 2010.
Evaluation of chromogenic media for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.
J Clin Microbiol. 48: 1040-1046.
- MALHOTRA-KUMAR, S., HACCURIA, K., MICHIELS, M., IEVEN, M., POYART, C., HRYNIEWICZ, W., GOOSSENS, H., 2008.
Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant Staphylococcus aureus and glycopeptide-resistant enterococcus species.
J Clin Microbiol. 46: 1577-1587.
- MEEMKEN, D., BLAHA, T., TEGELER, R., TENHAGEN, B. A., GUERRA, B., HAMMERL, J. A., HERTWIG, S., KASBOHRER, A., APPEL, B., FETSCH, A., 2010.
Livestock associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (LaMRSA) isolated from lesions of pigs at necropsy in northwest Germany between 2004 and 2007.
Zoonoses Public Health. 57: e143-148. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01313.x
- MEEMKEN, D., CUNY, C., WITTE, W., EICHLER, U., STAUDT, R., BLAHA, T., 2008.
Occurrence of MRSA in pigs and in humans involved in pig production--preliminary results of a study in the northwest of Germany.
Dtsch Tierarztl Wochenschr. 115: 132-139.
- MELLMANN, A., FRIEDRICH, A. W., KIPP, F., HINDER, F., KECKEVOET, U., HARMSSEN, D., 2005.
Evidence-based infection control methods using spa genotyping for MRSA spread in hospitals.
Dtsch Med Wochenschr. 130: 1364-1368.
- MELLMANN, A., HARMSSEN, D., 2009.
DNA-sequenzbasierte genotypische Methoden.
In: B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, & P. Kimmig.
Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 2. Auflage: 257.
- MELLMANN, A., WENIGER, T., BERSSENBRUGGE, C., KECKEVOET, U., FRIEDRICH, A. W., HARMSSEN, D., GRUNDMANN, H., 2008.
Characterization of clonal relatedness among the natural population of Staphylococcus aureus strains by using spa sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm.
J Clin Microbiol. 46: 2805-2808.
- MONECKE, S., KUHNERT, P., HOTZEL, H., SLICKERS, P., EHRLICH, R., 2007.
Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of Staphylococcus aureus isolates from cattle.
Vet Microbiol. 125: 128-140.

- MONECKE, S., RUPPELT, A., WENDLANDT, S., SCHWARZ, S., SLICKERS, P., EHRLICH, R., JACKEL, S. C., 2013.
Genotyping of Staphylococcus aureus isolates from diseased poultry.
Vet Microbiol. 162: 806-812.
- MROCZKOWSKA, A., ZMUDZKI, J., MARSZALEK, N., ORCZYKOWSKA-KOTYNA, M., KOMOROWSKA, I., NOWAK, A., GRZESIAK, A., CZYZEWSKA-DORS, E., DORS, A., PEJSK, Z., HRYNIEWICZ, W., WYSZOMIRSKI, T., EMPEL, J., 2017.
Livestock-associated Staphylococcus aureus on Polish pig farms.
PLoS One. 12: e0170745. doi:10.1371/journal.pone.0170745
- MUNSON, S. H., TREMAINE, M. T., BETLEY, M. J., WELCH, R. A., 1998.
Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from Staphylococcus aureus.
Infect Immun. 66: 3337-3348.
- MURCHAN, S., KAUFMANN, M. E., DEPLANO, A., DE RYCK, R., STRUELENS, M., ZINN, C. E., FUSSING, V., SALMENLINNA, S., VUOPIO-VARKILA, J., EL SOLH, N., CUNY, C., WITTE, W., TASSIOS, P. T., LEGAKIS, N., VAN LEEUWEN, W., VAN BELKUM, A., VINDEL, A., LACONCHA, I., GARAIZAR, J., HAEGGMAN, S., OLSSON-LILJEQUIST, B., RANSJO, U., COOMBES, G., COOKSON, B., 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: 1574-1585.
- NAIMI, T. S., LEDELL, K. H., BOXRUD, D. J., GROOM, A. V., STEWARD, C. D., JOHNSON, S. K., BESSER, J. M., O'BOYLE, C., DANILA, R. N., CHEEK, J. E., OSTERHOLM, M. T., MOORE, K. A., SMITH, K. E., 2001.
Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Minnesota, 1996-1998.
Clin Infect Dis. 33: 990-996.
- NEMATI, M., HERMANS, K., LIPINSKA, U., DENIS, O., DEPLANO, A., STRUELENS, M., DEVRIESE, L. A., PASMANS, F., HAESEBROUCK, F., 2008.
Antimicrobial resistance of old and recent Staphylococcus aureus isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398.
Antimicrob Agents Chemother. 52: 3817-3819.
- NEMEGHAIRE, S., ROELANDT, S., ARGUDIN, M. A., HAESEBROUCK, F., BUTAYE, P., 2013.
Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from healthy carrier chickens.
Avian Pathol. 42: 342-346.
- NG, E. Y., TRUCKSIS, M., HOOPER, D. C., 1994.
Quinolone resistance mediated by norA: physiologic characterization and relationship to flqB, a quinolone resistance locus on the Staphylococcus aureus chromosome.
Antimicrob Agents Chemother. 38: 1345-1355.

- O'MAHONY, R., ABBOTT, Y., LEONARD, F. C., MARKEY, B. K., QUINN, P. J., POLLOCK, P. J., FANNING, S., ROSSNEY, A. S., 2005.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland.
Vet Microbiol. 109: 285-296.
- O'RIORDAN, K., LEE, J. C., 2004.
Staphylococcus aureus capsular polysaccharides.
Clin Microbiol Rev. 17: 218-234.
- ORWIN, P. M., LEUNG, D. Y., TRIPP, T. J., BOHACH, G. A., EARHART, C. A., OHLENDORF, D. H., SCHLIEVERT, P. M., 2002.
Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins.
Biochemistry. 41: 14033-14040.
- PASANEN, T., KORKEILA, M., MERO, S., TARKKA, E., PIIPARINEN, H., VUOPIO-VARKILA, J., VAARA, M., TISSARI, P., 2010.
A selective broth enrichment combined with real-time nuc-mecA-PCR in the exclusion of MRSA.
Apmis. 118: 74-80.
- PATERSON, G. K., LARSEN, J., HARRISON, E. M., LARSEN, A. R., MORGAN, F. J., PEACOCK, S. J., PARKHILL, J., ZADOKS, R. N., HOLMES, M. A., 2012.
First detection of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 in bulk tank milk in the United Kingdom, January to July 2012.
Euro Surveill. 17: 1-6.
- PEETERS, L. E., ARGUDIN, M. A., AZADIKHAH, S., BUTAYE, P., 2015.
Antimicrobial resistance and population structure of Staphylococcus aureus recovered from pigs farms.
Vet Microbiol. 180: 151-156.
- PERRY, J. D., DAVIES, A., BUTTERWORTH, L. A., HOPLEY, A. L., NICHOLSON, A., GOULD, F. K., 2004.
Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant Staphylococcus aureus.
J Clin Microbiol. 42: 4519-4523.
- PERRY, J. D., RENNISON, C., BUTTERWORTH, L. A., HOPLEY, A. L., GOULD, F. K., 2003.
Evaluation of S. aureus ID, a new chromogenic agar medium for detection of Staphylococcus aureus.
J Clin Microbiol. 41: 5695-5698.
- PERSOONS, D., VAN HOOREBEKE, S., HERMANS, K., BUTAYE, P., DE KRUIF, A., HAESBROUCK, F., DEWULF, J., 2009.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in poultry.
Emerg Infect Dis. 15: 452-453.

- PINHO, M. G., DE LENCASTRE, H., TOMASZ, A., 2001.
An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci.
Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 10886-10891.
- POLKE-MAJEWSKI, K., 2016.
„*Massentierhaltung: Kann man trotz MRSA noch Fleisch essen?*“.
<http://www.zeit.de/wissen/gesundheit/2014-11/mrsa-fleisch-hygiene-kueche>
Abrufdatum:29.04.2018.
- POMBA, C., HASMAN, H., CAVACO, L. M., DA FONSECA, J. D., AARESTRUP, F. M., 2009.
First description of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) CC30 and CC398 from swine in Portugal.
Int J Antimicrob Agents. 34: 193-194.
- POUTREL, B., SUTRA, L., 1993.
Type 5 and 8 capsular polysaccharides are expressed by Staphylococcus aureus isolates from rabbits, poultry, pigs, and horses.
J Clin Microbiol. 31: 467-469.
- REED, K. D., STEMPER, M. E., SHUKLA, S. K., 2007.
Pulsed-field gel electrophoresis of MRSA.
Methods Mol Biol. 391: 59-69.
- REYNOLDS, P. E., 1989. *Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics.*
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 8: 943-950.
- RICHTER, A., SCHERKL, R., 2016.
Antibiotika und antibakteriell wirksame Chemotherapeutika.
In: W. Löscher & A. Richter.
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin,
Enke Verlag Stuttgart, 4. Auflage: 402-448.
- RICHTER, A., STING, R., POPP, C., RAU, J., TENHAGEN, B. A., GUERRA, B., HAFEZ, H. M., FETSCH, A., 2012.
Prevalence of types of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in turkey flocks and personnel attending the animals.
Epidemiol Infect. 140: 2223-2232.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI). 2009.
Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2008.
Epidemiol. Bull. 17: 155-160.

- ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI). 2011.
Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010.
Epidemiol. Bull. 26: 233-244.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI). 2013.
Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland - Update 2011/2012.
Epidemiol. Bull. 21: 187-193.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI). 2015.
Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland – Update 2013/2014.
Epidemiol. Bull. 31: 303-308.
- SAUER, S., FREIWALD, A., MAIER, T., KUBE, M., REINHARDT, R., KOSTRZEWA, M., GEIDER, K., 2008.
Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis.
PLoS One. 3: e2843. doi: 10.1371/journal.pone.0002843
- SAUER, S., KLIEM, M., 2010.
Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria.
Nat Rev Microbiol. 8: 74-82.
- SAUVAGE, E., KERFF, F., TERRAK, M., AYALA, J. A., CHARLIER, P., 2008.
The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis.
FEMS Microbiol Rev. 32: 234-258.
- SCHOBER, D., 2002.
Microarrays, Genexpressionsanalyse und Bioinformatik.
BIOspektrum. 8: 307-309.
- SCHUBERT, S., KOSTRZEWA, M., 2017.
MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends.
Curr Issues Mol Biol. 23: 17-20.
- SCHUBERT, S., WEIG, M., 2009.
MALDI-TOF-MS-basierte Verfahren zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen.
In: B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, & P. Kimmig.
Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie,
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 2. Auflage: 166-170.
- SCHUBERT, S., WIESER, A., 2010.
Molekulare Speziesdifferenzierung MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik.
BIOspektrum. 16: 760-762.

- SCHULZ, J., FRIESE, A., KLEES, S., TENHAGEN, B. A., FETSCH, A., ROSLER, U., HARTUNG, J., 2012.
Longitudinal study of the contamination of air and of soil surfaces in the vicinity of pig barns by livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus.
Appl Environ Microbiol. 78: 5666-5671.
- SCHWARTZ, D. C., CANTOR, C. R., 1984.
Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.
Cell. 37: 67-75.
- SCHWARZ, S., KADLEC, K., STROMMENGER, B., 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.
- SEIFERT, H., 2009. *MLSb-Resistenz bei Staphylokokken und Streptokokken.*
In: B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, & P. Kimmig.
Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 2. Auflage: 287-292.
- SHOPSIN, B., GOMEZ, M., MONTGOMERY, S. O., SMITH, D. H., WADDINGTON, M., DODGE, D. E., BOST, D. A., RIEHMAN, M., NAIDICH, S., KREISWIRTH, B. N., 1999.
Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of Staphylococcus aureus strains.
J Clin Microbiol. 37: 3556-3563.
- SMITH, T. C., MALE, M. J., HARPER, A. L., KROEGER, J. S., TINKLER, G. P., MORITZ, E. D., CAPUANO, A. W., HERWALDT, L. A., DIEKEMA, D. J., 2009.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers.
PLoS One. 4: e4258. doi:10.1371/journal.pone.0004258
- SPARBIER, K., LANGE, C., JUNG, J., WIESER, A., SCHUBERT, S., KOSTRZEWA, M., 2013.
MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling.
J Clin Microbiol. 51: 3741-3748.
- SPOHR, M., RAU, J., FRIEDRICH, A., KLITTICH, G., FETSCH, A., GUERRA, B., HAMMERL, J. A., TENHAGEN, B. A., 2011.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany.
Zoonoses Public Health. 58: 252-261.
- SPRINGER, B., ORENDI, U., MUCH, P., HOGER, G., RUPPITSCH, W., KRZIWANEK, K., METZ-GERCEK, S., MITTERMAYER, H., 2009.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a new zoonotic agent?
Wien Klin Wochenschr. 121: 86-90.

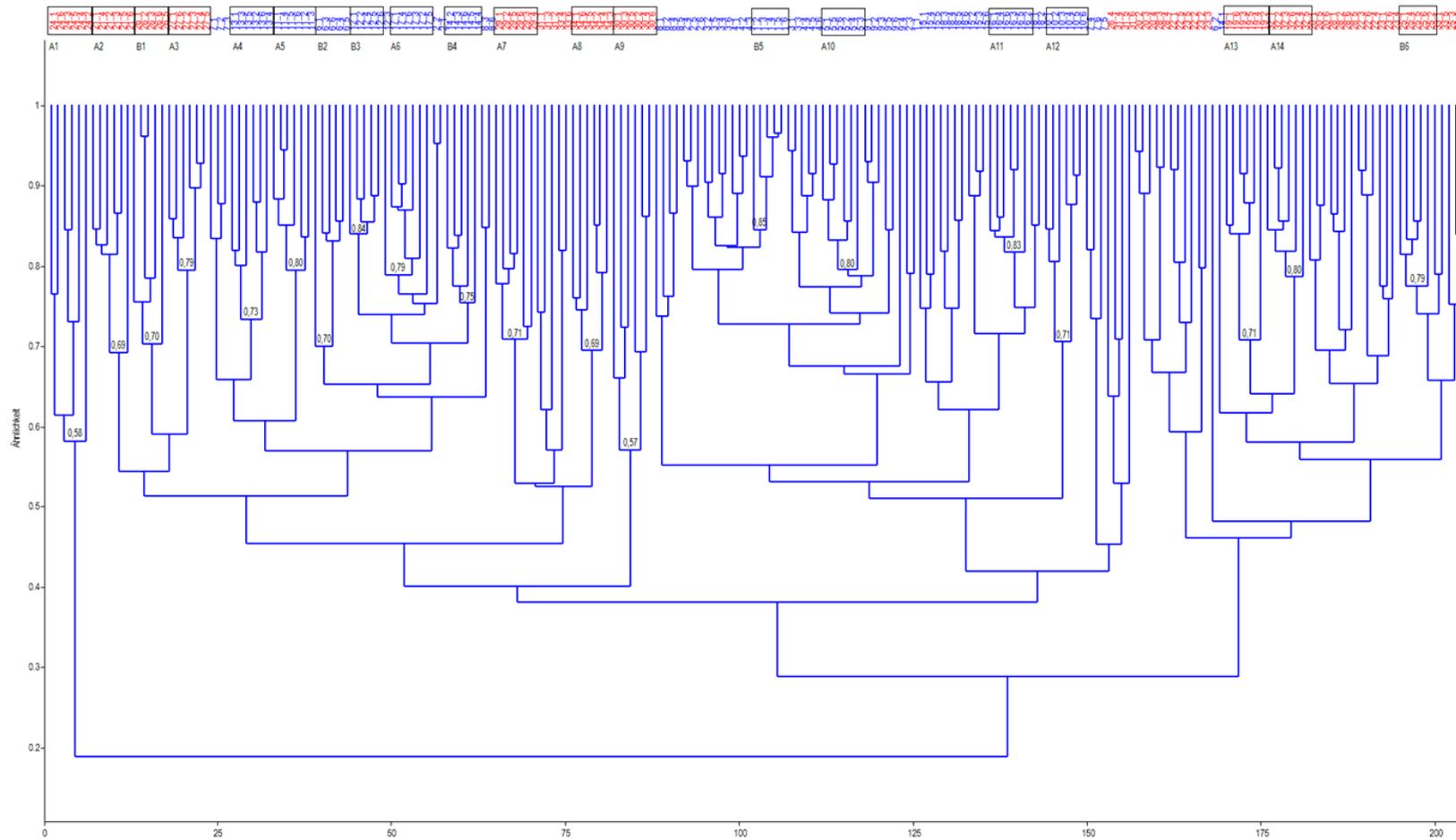
- STEGGER, M., LINDSAY, J. A., MOODLEY, A., SKOV, R., BROENS, E. M., GUARDABASSI, L., 2011.
Rapid PCR detection of Staphylococcus aureus clonal complex 398 by targeting the restriction-modification system carrying sau1-hsdS1.
J Clin Microbiol. 49: 732-734.
- STROMMENGER, B., BRAULKE, C., HEUCK, D., SCHMIDT, C., PASEMANN, B., NUBEL, U., WITTE, W., 2008.
spa Typing of Staphylococcus aureus as a frontline tool in epidemiological typing. J Clin Microbiol. 46: 574-581.
- STROMMENGER, B., KEHRENBERG, C., KETTLITZ, C., CUNY, C., VERSPOHL, J., WITTE, W., SCHWARZ, S., 2006.
Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from pet animals and their relationship to human isolates.
J Antimicrob Chemother. 57: 461-465.
- STRUELENS, M. J., 1996.
Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems.
Clin Microbiol Infect. 2: 2-11.
- TAVAKOL, M., RIEKERINK, R. G., SAMPIMON, O. C., VAN WAMEL, W. J., VAN BELKUM, A., LAM, T. J., 2012.
Bovine-associated MRSA ST398 in the Netherlands.
Acta Vet Scand. 54: 28.
- TE WITT, R., VAN BELKUM, A., VAN LEEUWEN, W. B., 2010.
Molecular diagnostics and genotyping of MRSA: an update.
Expert Rev Mol Diagn. 10: 375-380.
- TENHAGEN, B. A., FETSCH, A., STUHRENBERG, B., SCHLEUTER, G., GUERRA, B., HAMMERL, J. A., HERTWIG, S., KOWALL, J., KAMPE, U., SCHROETER, A., BRAUNIG, J., KASBOHRER, A., APPEL, B., 2009.
Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs.
Vet Rec. 165: 589-593.
- TENHAGEN, B. A., VOSSENKUHL, B., KASBOHRER, A., ALT, K., KRAUSHAAR, B., GUERRA, B., SCHROETER, A., FETSCH, A., 2014.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in cattle food chains - prevalence, diversity, and antimicrobial resistance in Germany.
J Anim Sci. 92: 2741-2751.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H., SWAMINATHAN, B., 1995.
Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.
J Clin Microbiol. 33: 2233-2239.

- THAKKER, M., PARK, J. S., CAREY, V., LEE, J. C., 1998.
Staphylococcus aureus serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model.
Infect Immun. 66: 5183-5189.
- THEURETZBACHER, U., 2006.
β-Lactamasen: Ein Gegner, der nicht besiegt werden kann.
Pharm Unserer Zeit. 35: 416-421.
- TRZCINSKI, K., COOPER, B. S., HRYNIEWICZ, W., DOWSON, C. G., 2000.
Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.
J Antimicrob Chemother. 45: 763-770.
- VALENTIN-WEIGAND, P., 2015.
Grampositive Kokken.
In: H.-J. Selbitz, U. Truyen, & P. Valentin-Weigand.
Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre,
Enke Verlag Stuttgart, 10. Auflage.
- VAN ALLEN, S., BALLHAUSEN, B., PETERS, G., FRIEDRICH, A. W., MELLMANN, A., KOCK, R., BECKER, K., 2017.
In the centre of an epidemic: Fifteen years of LA-MRSA CC398 at the University Hospital Munster.
Vet Microbiol. 200: 19-24.
- VAN BELKUM, A., VAN LEEUWEN, W., KAUFMANN, M. E., COOKSON, B., FOREY, F., ETIENNE, J., GOERING, R., TENOVER, F., STEWARD, C., O'BRIEN, F., GRUBB, W., TASSIOS, P., LEGAKIS, N., MORVAN, A., EL SOLH, N., DE RYCK, R., STRUELENS, M., SALMENLINNA, S., VUOPIO-VARKILA, J., KOOISTRA, M., TALENS, A., WITTE, W., VERBRUGH, H., 1998.
Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study.
J Clin Microbiol. 36: 1653-1659.
- VAN DE VIJVER, L. P., TULINSKI, P., BONDT, N., MEVIUS, D., VERWER, C., 2014.
Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in organic pig herds in The Netherlands.
Zoonoses Public Health. 61: 338-345.
- VAN DUIJKEREN, E., HENGEVELD, P., ZOMER, T. P., LANDMAN, F., BOSCH, T., HAENEN, A., VAN DE GIESSEN, A., 2016.
Transmission of MRSA between humans and animals on duck and turkey farms.
J Antimicrob Chemother. 71: 58-62.

- VAN DUIJKEREN, E., IKAWATY, R., BROEKHUIZEN-STINS, M. J., JANSEN, M. D., SPALBURG, E. C., DE NEELING, A. J., ALLAART, J. G., VAN NES, A., WAGENAAR, J. A., FLUIT, A. C., 2008.
Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains between different kinds of pig farms.
Vet Microbiol. 126: 383-389.
- VAN DUIJKEREN, E., JANSEN, M. D., FLEMMING, S. C., DE NEELING, H., WAGENAAR, J. A., SCHOORMANS, A. H., VAN NES, A., FLUIT, A. C., 2007.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs with exudative dermatitis.
Emerg Infect Dis. 13: 1408-1410.
- VAN VAERENBERGH, K., CARTUYVELS, R., COPPENS, G., FRANS, J., VAN DEN ABEELE, A. M., DE BEENHOUWER, H., 2010.
Performance of a new chromogenic medium, BBL CHROMagar MRSA II (BD), for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in screening samples.
J Clin Microbiol. 48: 1450-1451.
- VANDERHAEGHEN, W., CERPENTIER, T., ADRIAENSEN, C., VICCA, J., HERMANS, K., BUTAYE, P., 2010.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows.
Vet Microbiol. 144: 166-171.
- VINCZE, S., STAMM, I., KOPP, P. A., HERMES, J., ADLHOCH, C., SEMMLER, T., WIELER, L. H., LUBKE-BECKER, A., WALTHER, B., 2014.
Alarming proportions of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in wound samples from companion animals, Germany 2010-2012.
PLoS One. 9: e85656. doi: 10.1371/journal.pone.0085656
- VOLLMER, W., BLANOT, D., DE PEDRO, M. A., 2008.
Peptidoglycan structure and architecture.
FEMS Microbiol Rev. 32: 149-167.
- VOSS, A., LOEFFEN, F., BAKKER, J., KLAASSEN, C., WULF, M., 2005.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming.
Emerg Infect Dis. 11: 1965-1966.
- WAGENAAR, J. A., YUE, H., PRITCHARD, J., BROEKHUIZEN-STINS, M., HUIJSDENS, X., MEVIUS, D. J., BOSCH, T., VAN DUIJKEREN, E., 2009.
Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China.
Vet Microbiol. 139: 405-409.

- WALTHER, B., WIELER, L. H., FRIEDRICH, A. W., HANSEN, A. M., KOHN, B., BRUNNBERG, L., LUBKE-BECKER, A., 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.
- WANNET, W. J., SPALBURG, E., HECK, M. E., PLUISTER, G. N., TIEMERSMA, E., WILLEMS, R. J., HUIJSDENS, X. W., DE NEELING, A. J., ETIENNE, J., 2005.
Emergence of virulent methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains carrying Panton-Valentine leucocidin genes in The Netherlands.
J Clin Microbiol. 43: 3341-3345.
- WEESE, J. S., ZWAMBAG, A., ROSENDAL, T., REID-SMITH, R., FRIENDSHIP, R., 2011.
Longitudinal investigation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in piglets.
Zoonoses Public Health. 58: 238-243.
- WELKER, M., MOORE, E. R., 2011.
Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology.
Syst Appl Microbiol. 34: 2-11.
- WICHELHAUS, T. A., SCHÄFER, V., BRADE, V., 2000.
Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie.
Chemotherapie Journal. 9: 93-98.
- WITTE, W., STROMMENGER, B., CUNY, C., HEUCK, D., NUBEL, U., 2007a.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006.
J Antimicrob Chemother. 60: 1258-1263.
- WITTE, W., STROMMENGER, B., STANEK, C., CUNY, C., 2007b.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in humans and animals, Central Europe.
Emerg Infect Dis. 13: 255-258.
- WULF, M., VAN NES, A., EIKELBOOM-BOSKAMP, A., DE VRIES, J., MELCHERS, W., KLAASSEN, C., VOSS, A., 2006.
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in veterinary doctors and students, the Netherlands.
Emerg Infect Dis. 12:1939-1941.
- ZHANG, K., MCCLURE, J. A., ELSAYED, S., LOUIE, T., CONLY, J. M., 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.

10 Anhang



Anlage 1: Clusteranalyse der MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren mittels PAST-Software (n=204):

Bei einer Übereinstimmung von über 0,74 wurde Isolate, deren 6 Massenspektren in einem gemeinsamen Cluster vorlagen, auch als ähnlich eingestuft (schwarz umrandet). Isolate aus M1 sind in blau bzw. Isolate aus M2 in rot dargestellt. Auf der x-Achse wird die Ähnlichkeit bzw. auf der y-Achse die Anzahl der generierten Massenspektren dargestellt. Die Zahlen geben die händisch ermittelten Ähnlichkeitswerte wider.

Anlage 2: Ausgewählte MRSA-Isolate

Lfd.-Nr.	Probenschlüssel	Probenart	CC398 PCR	spa-Typ	MLST	PFGE
1	S1-W-NT1	Nasentupfer	+	t011		
2	S1-W-NT6	Nasentupfer	+	t011		
3	S1-W-HT1	Hauttupfer	+	t011		
4	S1-W-HT6	Hauttupfer	+	t011		
5	S1-W-IPi1	Impingerprobe innen	+	t011		
6	S1-W-IPi2	Impingerprobe innen	+	t011		
7	S1-W-IPi3	Impingerprobe innen	+	t011		
8	S1-W-SS	Sammelstaubprobe	+	t011		
9	S1-W-ST-Lee50	Sockentupfer 50m Lee	+	t011		
10	S1-W-ST-Lee300	Sockentupfer 300m Lee	+	t011		
11	S1-S-NT1	Nasentupfer	+	t011		
12	S1-S-NT6	Nasentupfer	+	t011		
13	S1-S-IPi1	Impingerprobe innen	+	t011		
14	S1-S-IPi2	Impingerprobe innen	+	t011		
15	S1-S-IPi3	Impingerprobe innen	+	t011		
16	S1-S-SS	Stammelstaubprobe	+	t011		
17	S1-S-ST-Lee150	Sockentupfer 150m Lee	+	t011		
18	S1-S-ST-Lee300	Sockentupfer 300m Lee	+	t011		
19	S2-W-NT1	Nasentupfer	+	t011		
20	S2-W-NT6	Nasentupfer	+	t011		
21	S2-W-HT6	Hauttupfer	+	t011		
22	S2-W-HT11	Hauttupfer	+	t011		
23	S2-W-IPi1	Impingerprobe innen	+	t011		
24	S2-W-IPi3	Impingerprobe innen	+	t011		
25	S2-W-SS	Sammelstaubprobe	+	t011		
26	S2-W-ST-Lee50	Sockentupfer 50m Lee	+	t011		
27	S2-S-NT1	Nasentupfer	+	t011		
28	S2-W-NT6	Nasentupfer	+	t011		
29	S2-W-IPi3	Impingerprobe innen	+	t011		
30	S2-W-IPa-Lee50	Impingerprobe innen	+	t011		

Lfd.-Nr.	Probenschlüssel	Probenart	CC398 PCR	spa-Typ	MLST	PFGE
31	S2-W-SS	Stammelstaubprobe	+	t011		
32	S2-W-ST-Lee50	Sockentupfer 50m Lee	+	t011		
33	S2-W-ST-Lee100	Sockentupfer 100m Lee	+	t011		
34	S2-W-ST-Lee150	Sockentupfer 150m Lee	+	t011		
35	S2-W-ST-Lee300	Sockentupfer 300m Lee	+	t011		
36	S3-S-NT1	Nasentupfer	+	t011		
37	S3-S-NT6	Nasentupfer	+	t011		
38	S3-S-IPi1	Impingerprobe innen	+	t011		
39	S3-S-IPi2	Impingerprobe innen	+	t011		
40	S3-S-IPi3	Impingerprobe innen	+	t011		
41	S3-S-SS	Stammelstaubprobe	+	t011		
42	S3-S-ST-Lee50	Sockentupfer 50m Lee	+	t011		
43	S3-S-ST-Lee150	Sockentupfer 150m Lee	+	t011		
44	S3-S-ST-Lee300	Sockentupfer 300m Lee	+	t011		
45	S3-S-ST-Lee500	Sockentupfer 500m Lee	+	t011		
46	S3-S-ST-Luv100	Sockentupfer 100m Luv	+	t011		
47	S3-W-NT1	Nasentupfer	+	t011		
48	S3-W-NT11	Nasentupfer	+	t011		
49	S3-W-HT1	Hauttupfer	+	t011		
50	S3-W-HT6	Hauttupfer	+	t011		
51	S3-W-IPi1	Impingerprobe innen	+	t011		
52	S3-W-IPi2	Impingerprobe innen	+	t011		
53	S3-W-IPi3	Impingerprobe innen	+	t011		
54	S3-W-SS	Sammelstaubprobe	+	t011		
55	S3-W-STi	Sockentupfer innen	+	t011		
56	S3-W-ST-Lee50	Sockentupfer 50m Lee	+	t011		
57	S3-W-ST-Lee150	Sockentupfer 150m Lee	+	t011		
58	S3-W-ST-Lee300	Sockentupfer 300m Lee	+	t011		
59	S3-W-ST-Lee500	Sockentupfer 500m Lee	+	t011		
60	S3-W-ST-Lee1000	Sockentupfer 1000m Lee	+	t011		

Lfd.-Nr.	Probenschlüssel	Probenart	CC398 PCR	spa-Typ	MLST	PFGE
61	S3-W-ST-Luv100	Sockentupfer 100m Luv	+	t011		
62	S4-F-NT1	Naentupfer	+	t011		
63	S4-F-NT6	Nasentupfer	+	t011		
64	S4-F-IPi1	Impingerprobe innen	+	t011		
65	S4-F-IPi2	Impingerprobe innen	+	t011		
66	S4-F-IPi3	Impingerprobe innen	+	t011		
67	S4-F-SS	Stallstaubprobe	+	t011		
68	S4-F-Fliegen	Fliegen	+	t011		
69	S4-F-ST-Lee50	Sockentupfer 50m Lee	+	t011		
70	S4-F-ST-Lee150	Sockentupfer 150m Lee	+	t011		
71	S4-W-N6	Nasentupfer	+	t011		
72	S4-W-N11	Nasentupfer	+	t011		
73	S4-W-HT1	Hauttupfer	+	t011		
74	S4-W-HT6	Hauttupfer	+	t011		
75	S4-W-IPi1	Impingerprobe innen	+	t011		
76	S4-W-IPi2	Impingerprobe innen	+	t011		
77	S4-W-IPi3	Impingerprobe innen	+	t011		
78	S4-W-SS	Sammelstaubprobe	+	t011		
79	S5-S-NT1	Nasentupfer	+	t108		
80	S5-S-NT6	Nasentupfer	+	t108		
81	S5-S-HT1	Hauttupfer	+	t108		
82	S5-S-HT6	Hauttupfer	+	t108		
83	S5-S-IPi1	Impingerprobe innen	+	t108		
84	S5-S-IPi2	Impingerprobe innen	+	t108		
85	S5-S-IPi3	Impingerprobe innen	+	t108		
86	S5-S-SS	Sammelstaubprobe	+	t108		
87	S5-S-SK	Sammelkotprobe	+	t108		
88	S5-S-ST	Sockentupfer	+	t108		
89	S5-S-ST-Lee50	Sockentupfer 50m Lee	+	t108		
90	S5-S-ST-Lee150	Sockentupfer 150m Lee	+	t1344		

Lfd.-Nr.	Probenschlüssel	Probenart	CC398 PCR	spa-Typ	MLST	PFGE
91	S5-S-ST-Lee300	Sockentupfer 300m Lee	+	t108		
92	S5-S-ST-Luv100	Sockentupfer 100m Luv	+	t108		
93	S5-W-NT1	Nasentupfer	+	t3479		
94	S5-W-NT6	Nasentupfer	+	t108		
95	S5-W-HT1	Hauttupfer	+	t108		
96	S5-W-HT6	Hauttupfer	+	t108		
97	S5-W-IPi1	Impingerprobe innen	+	t108		
98	S5-W-IPi2	Impingerprobe innen	+	t108		
99	S5-W-IPi3	Impingerprobe innen	+	t3479		
100	S5-W-IPi4	Impingerprobe innen	+	t3479		
101	S5-W-IPi5	Impingerprobe innen	+	t108		
102	S5-W-IPi6	Impingerprobe innen	+	t108		
103	S5-W-SS	Sammelstaubprobe	+	t108		
104	S5-W-SK	Sammelkotprobe	+	t108		
105	S5-W-STi1	Sockentupferprobe innen	+	t108		
106	S5-W-STi2	Sockentupferprobe innen	+	t3479		
107	S5-W-STi3	Sockentupferprobe innen	+	t108		
108	S5-W-ST-Lee50	Sockentupferprobe 50m Lee	+	t108		
109	S5-W-ST-Lee150	Sockentupferprobe 150m Lee	+	t108		
110	S5-W-ST-Lee300	Sockentupferprobe 300m Lee	+	t108		
111	S5-W-ST-Luv50	Sockentupferprobe 50m Luv	+	t108		
112	S6-S-NT1	Nasentupfer	+	t1451		
113	S6-S-NT6	Nasentupfer	+	t1451		
114	S6-S-HT1	Hauttupfer	+	t1451		
115	S6-S-HT6	Hauttupfer	+	t1451		
116	S6-S-IPi1	Impingerprobe innen	+	t1451		
117	S6-S-IPi2	Impingerprobe innen	+	t1451		
118	S6-S-IPi3	Filterprobe innen	+	t1451		
119	S6-S-SS1	Sammelstaubprobe	+	t1451		
120	S6-S-SS2	Sammelstaubprobe	+	t1451		

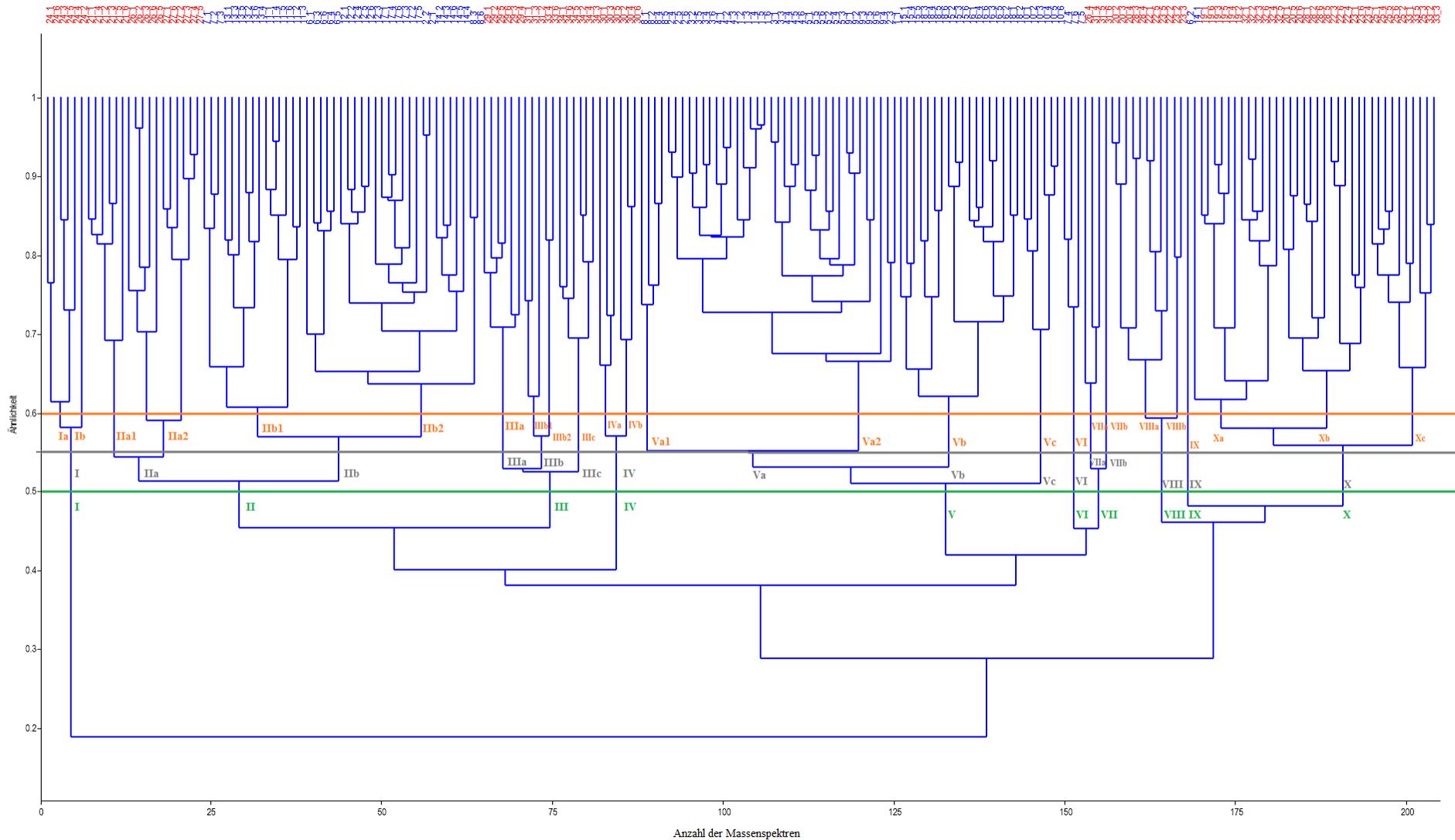
Lfd.-Nr.	Probenschlüssel	Probenart	CC398 PCR	spa-Typ	MLST	PFGE
121	S6-S-Sti	Sockentupfer innen	+	t1451		
122	S6-W-NT1	Nasentupfer	+	t1451		
123	S6-W-NT6	Nasentupfer	+	t1451		
124	S6-W-HT1	Hauttupfer	+	t1451		
125	S6-W-HT6	Hauttupfer	+	t1451		
126	S6-W-SS	Sammelstaubprobe	+	t1451		
127	S6-W-SK	Sammelkotprobe	+	t1451		
128	S6-W-STi1	Sockentupfer innen	+	t1451		
129	S6-W-STi2	Sockentupfer innen	+	t1451		
130	S6-W-ST-Lee50	Sockentupfer 50m Lee	+	t1451		
131	S6-W-ST-Lee150	Sockentupfer 150m Lee	+	t1451		
132	S6-W-ST-Lee300	Sockentupfer 300m Lee	+	t1451		
133	M1-HT11	Hauttupfer	-	t1430		
134	M1-CT6	Rachentupfer	-	t1430		
135	M1-SK	Sammelkotprobe	-	t1430		
136	M1-SD	Sedimentationsstaub	-	t1430		
137	M1-UT1	Umgebungstupfer	-	t1430		
138	M1-HT6	Hauttupfer	-	t1430		
139	M1-HT16	Hauttupfer	-	t1430		
140	M1-HT26	Hauttupfer	-	t1430		
141	M1-HT36	Hauttupfer	-	t1430		
142	M1-HT46	Hauttupfer	-	t1430		
143	M1-CT-1	Rachentupfer	-	t1430		
144	M1-CT-11	Rachentupfer	-	t1430		
145	M1-CT-21	Rachentupfer	-	t1430		
146	M1-CT-31	Rachentupfer	-	t899		
147	M1-CT-41	Rachentupfer	-	t1430		
148	M1-Futter	Futtersammelprobe	-	t1430		
149	M1-SS	Sammelstaubprobe	-	t1430		
150	M1-IPi1	Impingerprobe innen	-	t1430		

Lfd.-Nr.	Probenschlüssel	Probenart	CC398 PCR	spa-Typ	MLST	PFGE
151	M1-IPi2	Impingerprobe innen	-	t899	ST9	
152	M1-IPi3	Impingerprobe innen	-	t1430		
153	M1-ST-50Lee	Sockentupfer 50m Lee	-	t899		
154	M1-ST-150Lee	Sockentupfer 150m Lee	+	t034		
155	M1-ST-300Lee	Sockentupfer 300m Lee	-	t899		
156	M2-HT-Stall2	Hauttupfer	+	t108		
157	M2-STi	Sockentupfer innen	+	t1580		
158	M2-ST-Lee50-1	Sockentupfer 50m Lee	+	t034		
159	M2-ST-Lee50-2	Sockentupfer 50m Lee	-	t1430	ST9	
160	M2-ST-Lee50-3	Sockentupfer 50m Lee	+	t034		
161	M2-ST-Lee50-4	Sockentupfer 50m Lee	-	t1430		
162	M2-ST-Lee50-5	Sockentupfer 50m Lee	+	t034		
163	M2-ST-Lee150-1	Sockentupfer 150m Lee	+	t034		
164	M2-ST-Lee150-2	Sockentupfer 150m Lee	+	t034		
165	M2-ST-Lee150-3	Sockentupfer 150m Lee	+	t034		
166	M2-ST-Lee150-4	Sockentupfer 150m Lee	+	t034		
167	M2-ST-Lee150-5	Sockentupfer 150m Lee	+	t034		
168	M2-FPi2	Filterprobe innen	-	t1430		
169	M2-FPi3	Filterprobe innen	+	t108		
170	M2-SS	Sammelstaubprobe	+	t108		
171	M2-IPi1	Impingerprobe innen	-	t1430		
172	M2-UT2	Umgebungstupfer	+	t108		
173	M2-SD	Sedimentationsstaub	+	t108		
174	P1-HT-TH	Hauttupfer Tierhalter	+	t034		
175	P1-HT11	Hauttupfer	+	t5452		
176	P1-HT16	Hauttupfer	+	t034		
177	P1-CT11	Rachentupfer	+	t034		
178	P1-CT21	Rachentupfer	+	t034		
179	P1-UT1	Umgebungstupfer	+	t034		
180	P1-ST-Lee50-A	Sockentupfer 50m Lee	+	t5452		

Lfd.-Nr.	Probenschlüssel	Probenart	CC398 PCR	spa-Typ	MLST	PFGE
181	P1-ST-Lee50-B	Sockentupfer 50m Lee	+	t5452		
182	P1-ST-Lee50-C	Sockentupfer 50m Lee	+	t5452		
183	P1-ST-Lee50-D	Sockentupfer 50m Lee	+	t5452		
184	P1-ST-Lee50-E	Sockentupfer 50m Lee	+	t5452		
185	P1-ST-Lee150-A	Sockentupfer 150m Lee	+	t5452		
186	P1-ST-Lee150-B	Sockentupfer 150m Lee	+	t5452		
187	P1-ST-Lee150-C	Sockentupfer 150n Lee	+	t5452		
188	P1-ST-Lee150-D	Sockentupfer 150m Lee	+	t5452		
189	P1-IPi1	Impingerprobe innen	+	t034		
190	P1-IPi3	Impingerprobe innen	+	t5452		
191	P2-HT1	Hauttupfer	+	t011		
192	P2-HT2	Hauttupfer	+	t011		
193	P2-CT1	Choanentupfer	+	t011		
194	P2-CT2	Choanentupfer	+	t011		
195	P2-IPi1	Impingerprobe innen	+	t011		
196	P2-IPi2	Impingerprobe innen	+	t011		
197	P2-IPi3	Impingerprobe innen	+	t011		
198	P2-SS	Sammelstaubprobe	+	t011		
199	P2-SK	Sammelkotprobe	+	t011		
200	P2-FS	Futtersammelprobe	+	t011		
201	P2-STi1	Sockentupfer innen	+	t011		
202	P2-STi2	Sockentupfer innen	+	t011		
203	P2-ST-Lee50	Sockentupfer 50m Lee	+	t011		
204	P2-ST-Lee150	Sockentupfer 150m Lee	+	t1250		
205	P2-ST-Lee300	Sockentupfer 300m Lee	+	t1250		
206	P2-ST-Luv100	Sockentupfer 100m Luv	+	t034		
207	P2-IPa-Lee50	Impingerprobe 50m Lee	+	t011		
208	P2-IPa-Lee150	Impingerprobe 150m Lee	+	t011		
209	P3-3-HT12-15	Hauttupfer	+	t5452		
210	P3-3-HT17-20	Hauttupfer	+	t5452		

Lfd.-Nr.	Probenschlüssel	Probenart	CC398 PCR	spa-Typ	MLST	PFGE
211	P3-3-CT27-30	Rachentupfer	+	t5452		
212	P3-3-CT27-30	Rachentupfer	+	t5452		
213	P3-3-SD	Sedimentationsstaub	+	t5452		
214	P3-3-STi	Sockentupfer innen	+	t011		
215	P3-3-ST-Lee300	Sockentupfer 300m Lee	+	t011		
216	P3-4-HT-1	Hauttupfer	+	t5452		
217	P3-4-HT6-2	Hauttupfer	+	t5452		
218	P3-4-CT1	Rachentupfer	+	t5452		
219	P3-4-CT12-15	Rachentupfer	+	t5452		
220	P3-4-UT3	Umgebungstupfer	+	t5452		
221	P3-4-Futter	Futtersammelprobe	+	t5452		
222	P4-HT1	Hauttupfer	+	t011		
223	P4-HT2	Hauttupfer	+	t011		
224	P4-CT-2	Choanentupfer	+	t011		
225	P4-CT1	Choanentupfer	+	t011		
226	P4-IPi1	Impingerprobe innen	-	t002		
227	P4-IPi2	Impingerprobe innen	+	t011		
228	P4-FPi3	Filterprobe innen	+	t011		
229	P4-SS	Sammelstaubprobe	-	t1430		
230	P4-SK	Sammelkotprobe	-	t002	ST5	
231	P4-STi1	Sockentupfer innen	+	t011		
232	P4-STi2	Sockentupfer innen	-	t002		
233	P4-ST-Lee50	Sockentupfer 50m Lee	+	t011		
234	P4-ST-Lee150	Sockentupfer 150m Lee	+	t011		
235	P4-ST-Lee300	Sockentupfer 300m Lee	+	t034		
236	P4-ST-Luv100	Sockentupfer 100m Luv	+	t011		
237	P4-IPa-Lee50	Impingerprobe 50m Lee	+	t011		
238	P4-IPa-Lee150	Impingerprobe 150m Lee	+	t011		

S1 – S6 = Schweinebestand 1 – 6, F= Frühling, S= Sommer; W= Winter; M1 – M2= Masthähnchenbestand 1 -2,
P1 – P4= Putenbestand 1; Die grünen Kästchen kennzeichnen Isolate die mittels Makrorestriktionsanalyse typisiert wurden



Anlage 3: Clusteranalyse der MALDI-TOF-MS generierten Massenspektren mittels PAST-Software (n=204): Isolate aus M1 sind in blau bzw. Isolate aus M2 in rot dargestellt. Die Linien der Farben grün, grau und orange repräsentieren die unterschiedlichen Grenzwerte (0,5; 0,555; 0,6). Die römischen Zahlen repräsentieren die unterschiedlichen MALDI-Cluster. Auf der x-Achse wird die Ähnlichkeit bzw. auf der y-Achse die Anzahl der generierten Massenspektren dargestellt.

Anlage 4: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten MALDI-Cluster aus Anlage 3

Grenzwert	ermittelte MALDI-Cluster	Anzahl MALDI-Cluster
0,5	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X	n=10
0,55	I, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IIIc, IV, Va, Vb, Vc, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X	n=16
0,6	Ia, Ib, IIa1, IIa2, IIb1, IIb2, IIIa, IIIb1, IIIb2 IIIc, IVa, IVb, Va1, Va2, Vb, Vc, VI, VIIa, VIIb, VIIIa, VIIIb, IX, Xa, Xb, Xc	n=25

11 Publikationsverzeichnis

Poster:

Krueger, K.; Roesler, U.; Schulz, J.; Hartung, J.; Friese, A. (2013):

Relationship of MRSA in various samples from inside and outside of different poultry farms.

3rd ASM-ESCMID Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals: Veterinary and Public Health Implications

Copenhagen – 04.11.-07.11.2013.

12 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Uwe Rösler, nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Mein aufrichtiger und herzlicher Dank gilt des Weiteren Frau Dr. Anika Friese. Einerseits für die fachliche Betreuung, andererseits für die vielen konstruktive Ratschläge und die immerwährende Motivation.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn Dr. Jayaseelan Murugaiyan für seine Hilfe bei den Analysen mittels MALDI-TOF-MS.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Sebastian Günther für seine fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Microarray-Analysen bedanken.

Frau PD Dr. med. vet. habil. Roswitha Merle sei recht herzlich für Ihre Mithilfe bei der statistischen Auswertung gedankt.

Frau Heike Rose, Frau Maja Thieck, Frau Susann Sellenthin und Herrn Michael Kühl danke ich für ihre kollegiale Zusammenarbeit im Labor.

Ein großer Dank gilt auch meinen lieben Kollegen Henriette Laube, Alexandra Irrgang und Nils Kühl sowie Katrin Dähre und Michaela Projahn. Ich danke euch für das gegenseitige Motivieren, eure stetige Hilfsbereitschaft und das Verbreiten von positiver Energie in unseren vier Bürowänden.

Klappe die Zweite, liebe Alex. Ich möchte dir nochmals von Herzen für deine Unterstützung auf den letzten Zielmetern danken.

Ein besonderer Dank gilt auch Karin und Dr. Wolfgang Dalk, die sich mit Adleraugen der Korrektur dieser Arbeit gewidmet haben.

Danke Mayk, dass du mich ein Stück auf meinem Weg begleitet hast.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meinem Opi, Chrissy und Mirko aber auch Elvira und Uwe, danke ich für ihre beständige Unterstützung. Ihr seid meine Insel und ich liebe euch. Fabi, trotz der vielen launischen Sturmböen bist du keinen Zentimeter von meiner Seite gewichen. Ich bin glücklich, dass wir dieses Kapitel gemeinsam beendet haben und freue mich auf alle weiteren, die wir zukünftig schreiben werden

Omi ich danke dir für alles was ich bin. Du fehlst mir jeden Tag. Dir und Ida ist diese Arbeit gewidmet.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 29.04.2019

Karolin Krüger



9 783863 879761

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-976-1