

7 Zusammenfassung

Einige *S. aureus*-Populationen, die sich im hospitalassoziierten Milieu seit vielen Jahren etabliert haben, erlangen multiple Resistenzen durch die Akkumulation verschiedener Resistenzdeterminanten. Insbesondere Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) sind heute weltweit einer der häufigsten Verursacher von sporadischen sowie endemischen Infektionen in Krankenhäusern, anderen Gesundheitseinrichtungen und auch in ambulanten Bereichen.

Seit den frühen 70er Jahren werden MRSA-Fälle auch bei Tieren berichtet. In den letzten Jahren kam es jedoch zu einem deutlichen Anstieg von Berichten über MRSA-infizierte Tiere, insbesondere bei Kleintieren und Pferden in klinischen Einrichtungen. Auch die Frage nach dem zoonotischen Charakter animaler MRSA wird zunehmend diskutiert.

Diese Arbeit verfolgte deshalb vier wesentliche Ziele. Zunächst wurden vergleichend Untersuchungen zu verschiedenen phänotypischen Nachweisverfahren für die MRSA-Diagnostik in der Veterinärmedizin durchgeführt. Ein zweiter Punkt war die Erfassung von Daten über das Vorkommen, die Typisierung sowie die genetische Charakterisierung von MRSA-Isolaten von Pferden und Kleintieren. In Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin wurde das dritte Ziel verfolgt, die Aufdeckung von möglichen zoonotischen Transmissionswegen sowie die nosokomiale Verbreitung von MRSA in klinischen Einrichtungen der Veterinärmedizin unter Einbeziehung von Tieren, Menschen und Gegenständen. Das vierte angestrebte Ziel dieser Arbeit umfasste die Analyse der gesammelten Daten unter epidemiologischen Gesichtspunkten und Einordnung der untersuchten Isolate in die bislang bekannten *S. aureus*-Population sowie den Vergleich zu einigen häufig auftretenden humanen Epidemiestämmen.

Um alle MRSA-Isolate zu typisieren, wurden verschiedene international gebräuchliche Methoden eingesetzt. Durch den Einsatz einer Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) nach Makrorestriktion mittels der Endonuklease *Sma*I war ein Vergleich der Restriktionsmuster des Gesamtgenoms aller Isolate realisierbar. Unter Anwendung der Multi-Locus-Sequenztypisierung (MLST) war eine Zuordnung der hier aufgetretenen mit bereits bekannten und in einer Online-Datenbank (www.mlst.net) hinterlegten Sequenztypen (ST) möglich. Die Typisierung des mobilen Staphylokokken-Austauschsystems (SCC*mec*), welches den *mec*-Komplex beinhaltet, wurde in dieser Arbeit mit einer bereits beschriebenen Multiplex-Strategie verfolgt, die jedoch nicht in jedem Fall zu einem eindeutigen Ergebnis führte.

Insgesamt sind in dieser Arbeit 1544 Einzelproben (davon 144 vordifferenzierte Keimisolate aus anderen veterinärmedizinischen diagnostischen Laboren) von Tieren, Menschen und Gegenständen untersucht worden. Im ersten Abschnitt wurden die verschiedenen Verfahren für den phänotypischen Nachweis animaler MRSA vergleichend getestet, wobei festgestellt werden konnte, dass der Agardiffusionstest mit Cefoxitin (30µg) anderen Methoden, wie z.B. dem Agardiffusionstest mit Oxacillin 1 und 5µg sowie dem Einsatz eines Oxacillin-Screeningagars, deutlich unterlegen ist. Der Goldstandard für den Nachweis der Resistenzdeterminante *mecA* ist jedoch noch immer ein spezifischer Gennachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), möglichst verbunden mit einem eindeutigen Speziesnachweis. Zu diesem Zweck wurde eine Triplex-PCR erarbeitet, die neben dem für die β-Lactamresistenz verantwortlichen Gen *mecA* gleichzeitig Spezies-spezifische Nachweise von *S. aureus* und *S. intermedius* ermöglicht.

Im zweiten Teil der Ergebnisse wurden MRSA-Isolaten von Pferden und Kleintieren analysiert.

In den insgesamt 135 untersuchten Proben (davon 70 *S. aureus*) von Pferden aus unterschiedlichen Bundesländern von verschiedenen klinisch infizierten Tieren konnte in 11 Proben (15,7%) ein MRSA-Nachweis geführt werden. Die dabei aufgetretenen Genotypen, welche in dieser Arbeit mit den Großbuchstaben "A", "B", "C" benannt wurden, erzielten in

der Analyse dieser Muster aus der PFGE einen genetischen Übereinstimmungsgrad von ca. 86%, der sich auch in der engen Verwandtschaft der mittels MLST ermittelten Sequenztypen ST8 und ST254 widerspiegelt. Diese ST unterscheiden sich tatsächlich lediglich in einem Basenpaar im ersten Allel der für die Bestimmung herangezogenen definierten Abschnitte von sieben konservativen Haushaltsgenen. Leider schränkt die begrenzte Anzahl der untersuchten Isolate von Pferden die Aussagekraft der Daten ein. Alle Staphylokokken-Genkassetten (SCC*mec*) aus equinen MRSA-Isolaten waren Vertreter der bislang kleinsten bekannten Kasette vom Typ SCC*mec* IV.

Weitere 6 MRSA-Isolate von Kleintieren aus anderen Bundesländern zeigten die PFGE-Muster: "F", "D" und "H" sowie Subtypen. Die hier durch MLST ermittelten Sequenztypen waren ST254, ST225 und ST239. Während bei fünf Isolaten ebenfalls SCC*mec* IV auftrat, zeigte sich ein Isolat aus Gießen (ST225) positiv für SCC*mec* II.

Im dritten Abschnitt dieser Arbeit wurde *S. aureus* in der Kleintierklinik über einen Zeitraum von 20 Monaten in insgesamt 6,9% (60/866) der klinischen Proben gefunden. 26 von diesen waren *mecA*-positiv, darunter auch Isolate von so exotischen Tieren wie Papagei, Schildkröte oder Fledermaus.

Außerdem wurden Nasentupfer von Hunden (257 Tupfer von 191 Tieren), von Menschen (dreimal n=62, n=62 und n=88) und Objekten (20) untersucht. Dabei wurde in 6 Fällen bei Hunden, bei 20 Personen und an 3 Objekten ein MRSA Nachweis geführt. Lokal dominierten hier überwiegend zwei verschiedene PFGE Typen, hier als "G" und "D" bezeichnet. Die MLST-Analyse zeigte zwei genetisch unterschiedliche MRSA-Klone: PFGE-Typ "G" entspricht dem ST22, der PFGE-Typ "D" hingegen entspricht dem ST239. Neben dem SCC*mec* IV, der generell bei PFGE Typ "D" nachzuweisen war, schlug die eindeutige Charakterisierung der Genkasette des PFGE-Typs "G" mit denen in dieser Arbeit eingesetzten Techniken fehl.

Eine Auswertung der Daten aus der Kleintierklinik unter einigen epidemiologischen Aspekten zeigte, dass eine zeitweise nosokomiale Verbreitung der genannten Klone innerhalb dieser Institution angenommen werden darf.

Den Abschluss dieser Arbeit bildete die Einordnung der bei animalen MRSA-Isolaten dieser Arbeit aufgetretenen STen in einen *S. aureus*-Populationszusammenhang, der hier unter Einbeziehung von Daten über bislang bekannte *S. aureus*-STen aus der Datenbank www.mlst.net durch die Erstellung eines Minimum-Spanning-Trees. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle in dieser Arbeit aufgetreten STen (ST8, ST239, ST254, ST225, ST22) bereits häufig in der Humanmedizin als MRSA in Erscheinung getreten sind und etablierten klonalen Komplexen angehören, also keinesfalls "neue" genotypische Linien begründen oder vertreten.

Die vorliegenden Daten belegen, dass sich nosokomiale Infektionen, insbesondere solche durch MRSA, sich in der Veterinärmedizin etabliert haben. Aufgrund der ständigen Anpassungsvorgänge der Infektionserreger an ihre Umgebung und ihr hohes Adaptionsvermögen an Wirtsorganismen anderer Spezies ist die Erarbeitung standardisierter Hygienerichtlinien, die der Transmission von Tier zu Tier aber auch zwischen Mensch und Tier entgegenwirken, auch für veterinärmedizinischen Praxen und Kliniken erforderlich.

Die Bedeutung von MRSA-Infektionen bei Tieren als Quelle und / oder Reservoir für MRSA-Erkrankungen beim Menschen ist bislang noch vollkommen ungeklärt. Durch die nachweislich leichte Übertragbarkeit, insbesondere in einer Umgebung mit Selektionsdruck (Praxis, Klinik), ist jedoch davon auszugehen, dass das Risiko für Transmissionen zwischen Mensch und Tier bei engem Kontakt bzw. mangelnder Hygiene nicht zu unterschätzen ist.