

3 Material

3.1 Probenherkunft und Probenanzahl

Vorausschickend ist festzuhalten, dass in dieser Arbeit mit einer Probe ein zunächst unbewerteter Abstrich, Tupfer, Flüssigkeit, Gegenstand oder sonstiges Material, mit dem Ausdruck Isolat hingegen ein konkreter bakteriologischer Befund in einer bestimmten Probe / Probenkonvolut bezeichnet wird.

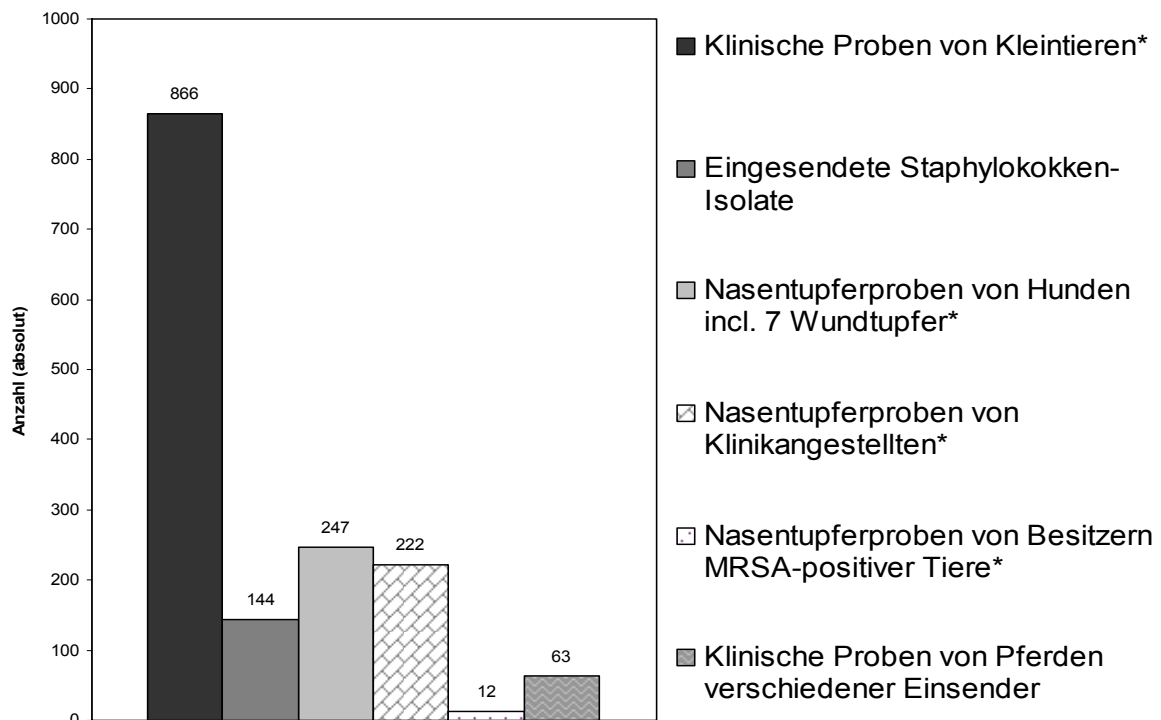
Diese Arbeit beinhaltet bis auf wenige Ausnahmen vorrangig Proben, die in den Jahren 2003 und 2004 an das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen (IMT) eingesendet und dort untersucht wurden. Die Ausnahmen (Isolate aus der Stammsammlung des IMT, Isolate von anderen diagnostischen Laboren) werden in den jeweiligen Abschnitten mit dem Isolierungsdatum benannt, soweit dieses zu ermitteln war.

In diese Arbeit haben insgesamt 1544 Proben (davon 144 vordifferenzierte Keimisolat aus anderen veterinärmedizinischen diagnostischen Laboren) von Tieren, Menschen und Gegenständen Eingang gefunden (Abbildung 1). Da in einer klinischen Probe bis zu drei verschiedene Staphylokokken-Spezies vorgekommen sind, beträgt die Gesamtzahl der untersuchten *Staphylococcus spp.* 1023. In Tabelle 2 ist die Anzahl aller Isolate ihrer Herkunft nach (Tier, Mensch, Gegenstand) aufgeschlüsselt.

8 Einsendungen vordifferenzierter *Staphylococcus aureus* - Isolate stammen aus dem Institut für Mikrobiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, 16 Einsendungen vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., 100 Einsendungen aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen, 5 Einsendungen aus dem Landesuntersuchungsamt für Verbraucherschutz und Landwirtschaft Potsdam sowie 15 Einsendungen aus dem Institut für Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Ludwig-Maximilians Universität München.

675 untersuchte Isolate stammten aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin. Untersucht wurden Isolate von verschiedenen Tierarten, von Gegenständen aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin sowie von Menschen, die entweder täglich mit Tieren arbeiten oder Besitzer bzw. Angehörige eines MRSA-positiven Tieres waren. Im weiteren Text wird die Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin mit dem Ausdruck "Kleintierklinik" abgekürzt.

Abbildung 1: Zusammensetzung der in dieser 1544 Proben



*aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin

Tabelle 2: Zusammensetzung der insgesamt 1023 untersuchten Isolate

Probenherkunft	Anzahl der untersuchten Isolate
Hund	487
Mensch	234
Pferd	135
Katze	46
Gegenstände	25
Rind	20
unbekannte Tierart	19
Maus	14
Vogel	9
Kaninchen	7
Schwein	6
Meerschwein	5
Ratte	5
Ziege	3
Affe	3
Schaf	1
Tamandua	1
Hirsch	1
Fledermaus	1
Schildkröte	1
Summe	1023

Zusammensetzung des Probenmaterials aus der Kleintierklinik

Das Vorkommen und die quantitative Erfassung von MRSA-Fällen bei Kleintieren ist ein Ziel dieser Arbeit. Epidemiologische Vergleichsanalysen sowohl innerhalb einer Institution (hier: Tierklinik) sowie mit humanen MRSA-Isolaten werden darüber hinaus ebenfalls angestrebt. Um diesen Zielen gerecht zu werden wurde in Absprache und enger Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin (im weiteren Text: Kleintierklinik) eine Untersuchung auf MRSA bei Hunden und Menschen eingeleitet.

Zum einen wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen (vom 27.04.2003 bis zum 30.07.2003) 267 Nasentupfer- sowie 7 Wundtupferproben von 191 Hunden entnommen, die einen stationären Aufenthalt in der Kleintierklinik hatten. Diese Proben wurden nach Möglichkeit zu Beginn des Aufenthaltes (max. 36h nach Aufnahme) und kurz vor der Entlassung entnommen. Aus verschiedenen Gründen konnten nicht von allen Tieren zwei Tupfer gewonnen werden, so dass von insgesamt 67 Tieren ein Aufnahme- und ein Entlassungstupfer ausgewertet werden konnte. Alle Tupferproben wurden noch am Entnahmetag auf Hammelblutplatten ausgestrichen sowie in BHI-Bouillon angereichert. Diese Anreicherung wurde nur auf Hammelblut ausgestrichen, wenn der direkte Tupferausstrich kein Wachstum nach 18h Kultivierung bei 37°C zeigte. Ergänzt wurde die Untersuchung der Tiere durch ein dreimaliges Screening von Nasentupferproben der Angestellten in der Kleintierklinik, initial zu Beginn der Untersuchungen und nach 12 Wochen. Eine dritte Untersuchung wurde im April/Mai 2004 aufgrund einer auffällig ansteigenden Rate von MRSA-Infektionen bei klinischen Patienten durchgeführt.

Aus insgesamt 866 Proben der Kleintierklinik wurden 675 Staphylokokken-Isolate untersucht.

Liste der verwendeten *S. aureus*-Kontrollstämme

Für die in dieser Arbeit beschriebenen phäno- und genotypischen Methoden zur MRSA-Identifizierung und Typisierung dienten die in Tabelle 2 aufgelisteten Referenz- bzw. Typenstämme:

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Typen- und Referenzstämme

Stamm	Spezies	Relevante Eigenschaften	Herkunft	Quelle/Referenz
DSMZ 4910	MSSA	<i>mecA</i> -negativ	Deutschland	DSMZ ¹
ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	Referenzstamm	Deutschland	NCCLS ⁴
IMT-6689	<i>S. intermedius</i>	<i>mecA</i> -negativ	Deutschland	IMT ² Stammsammlung
Süddeutscher Epidemiestamm	MRSA	<i>mecA</i> -positiv	Deutschland	Prof. Dr. W. Witte ³
Barnimer Epidemiestamm	MRSA	<i>mecA</i> -positiv	Deutschland	Prof. Dr. W. Witte ³
Rhein-Hessen Epidemiestamm	MRSA	<i>mecA</i> -positiv	Deutschland	Prof. Dr. W. Witte ³
Süddeutscher Epidemiestamm	MRSA	<i>mecA</i> -positiv	Deutschland	Prof. Dr. W. Witte ³
Berliner Epidemiestamm	MRSA	<i>mecA</i> -positiv	Deutschland	Prof. Dr. W. Witte ³
Wien Epidemiestamm	MRSA	<i>mecA</i> -positiv	Deutschland	Prof. Dr. W. Witte ³
Hannover Epidemiestamm	MRSA	<i>mecA</i> -positiv	Deutschland	Prof. Dr. W. Witte ³
IMT-642-05	MSSA	PVL-positiv	Deutschland	Dr. A. W. Friedrich ⁵

¹ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

² Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin

³ Nationales Referenzzentrum für Staphylokokken, Robert Koch Institut, Wernigerode

⁴ National Committee for Clinical Laboratory Standards (142)

⁵ Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster

3.2 Geräte

Elektrophorese-Kammern	AGS (Heidelberg); Hybaid (Heidelberg); MWG Ebersberg)
Mikroskop ID03	Zeiss (Jena)
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel Gläser
pH- Meter	Knick 766 Calimatic
Photospektrometer	Amersham Pharmacia Biotech Ultraspec® 3000
Pipetten	Eppendorf Research (Hamburg)
Pulsfeldgelelektrophorese-Kammer und Cooling Module	RAD-Chef DR® III System; BioRad (München)
Reaktionsgefäße (0,2 – 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße (12, 5 – 50 ml)	Greiner Bio One GmbH
Schüttler	IKA Labortechnik KS 250 basic (Staufen i. Br.)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, C 24 Incubator Shaker (Nürtingen)
Spannungsgerät	Hybaid PS 250 (Hamburg)
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments HB2448 (Hanau)
Thermocycler	Touchdown, Hybaid (Hamburg)
Thermodrucker	Herolab; Video Graphic Printer UP 890 CE (Wiesloch)
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415D (Hamburg)
Transilluminator	Herolab; E.A.S.Y. 429K; ICU 1; (Wiesloch)
UV- Licht	Biometra TI 1 (Göttingen)
UV- Tisch	IKA MS2 Minishaker (Staufen i.Br.)
Vortexer	Sartorius LA 230S und BP 2100 (Göttingen)
Waage	WTB Binder (Tuttlingen)
Wärmeschrank	Th. Karow GmbH (Berlin)
Wasserbad	Hettich Universal K2S
Zentrifuge	

3.3 Chemikalien

Folgende Reagenzien wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen:

Lysostaphin	Sigma-Alderich (Deisenhofen)
Proteinase K	Serva (Heidelberg)
Lysozym	Serva (Heidelberg)
Phenol- Chloroform	Sigma-Alderich (Deisenhofen)
Isoamyl-Alkohol	Sigma-Alderich (Deisenhofen)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid (3%)	Roth (Karlsruhe)
Plasmakoagulase	Becton, Dickinson & Co.
Mast Swab®	MAST Diagnostika
Antibiotika-Testplättchen	Oxoid (Wesel)
Oxacillin	Sigma-Alderich (Deisenhofen)
Restriktionsendonuklease <i>Sma</i> I	New England Biolabs® GmbH

3.4 Nährmedien

Folgende Nährmedien wurden exakt nach Herstellerangaben zubereitet und eingesetzt:

Brain Heart Infusion (BHI)		Oxoid (Wesel)	
Mueller-Hinton-Bouillon (MHB)		Sifin (Berlin)	
Blutagar	Pankreatisches Pepton (Fleisch)		5,00g/l
	Pankreatisches Pepton (Gelantine)		5,00g/l
	Pankreatisches Pepton (Fleisch)		5,00g/l
	Eiweißhydrolysat		3,50g/l
	Hefextrakt		3,50g/l
	NaCl		5,00g/l
	Agar	pH7,5 (+/- 0,2)	10,00g/l
	Autoklaviert bei 121°C, abgekühlt	auf 40-50°C	
	Anschließende Zugabe von defibriniertem Schafblut		
Oxacillin-Screening-Agar	Müller-Hinton Agar		5,00g/l
	NaCl		4,00g/l
	Oxacillin		2,00mg/l

Autoklaviert bei 121°C, abgekühlt auf 40-50°C

Für den Mannit-Fermentationstest wurde folgendes Medium hergestellt:

CTA- Medium (Becton, Dickinson & Co, Heidelberg) unter Zugabe von 1% Mannit (Merck, Darmstadt).

3.5 Lösungen

Lösungen für die DNS- Extraktion :

TE Puffer	EDTA	1mM	
	Tris-HCl	10mM	
		pH 7,5	
			ad 10ml
			A. bidest

Lösungen für die DNS- Extraktion zur Verwendung für MLST-Analysen

MLST-Lysispuffer	EDTA	500 mM	
	Tris-HCl	1 M	
	Lysozym	5000 U/ml	
	Lysostaphin	500 U/ml	
			ad 10 ml
			A. bidest

Lösungen für die Agarosegelelektrophorese (DNS)

TBE-	Tris	890 mM	107,82 g
Puffer	Borsäure	890 mM	55,03 g
Stamm-	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	18,62 g
Lösung	Eingestellt mit NaOH		auf 100 ml
(10xkonz.)			davon 40 ml
			auf 1000 ml
			A. bidest
Stop-	Formamid		9,50 ml
Lösung	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	0,40 ml
	Bromphenolblau		5,00 mg
	Xylencyanol FF		5,00 mg
	A. bidest		0,100 ml
Agarose	Agarose		0,70 g
			auf 100 ml
			1 x TBE

Ethidiumbromidlösung 1%

Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

10 x	Tris-HCl, pH 8,4	200 mM
PCR buffer ¹	KCl	500 mM
Taq DNA		5 U/μl
Polymerase ¹		
Magnesium-		50 mM
Chlorid Solution		
dNTP ²	PCR Nukleotide Mix:	je dNTP 10 mM
	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	

¹ GIBCO BRL®, Life Technologies

² Promega Corporation

Lösungen für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und Puffer für die PFGE von MRSA

Zellsuspensions-Puffer	EDTA	50 mM	1,861g
	NaCl	20 mM	0,117g
	Tris-HCl	10 mM	1,211g
	pH 7,2 eingestellt mit HCl		auf 100 ml A. bidest
Lysispuffer	NaCl	50 mM	0,292g
	Tris-HCl	10 mM	1,211g
	EDTA	50 mM	1,861g
	Deoxycholat	0,2 %	0,2g
	Sarcosyl	0,5 %	0,5g
	pH 7,2 eingestellt mit HCl		auf 100 ml A. bidest
Waschpuffer	Tris-HCl	10 mM	1,211g
	EDTA	0,1 mM	0,004g
	pH 7,6 eingestellt mit HCl		auf 100 ml A. bidest
PK- Puffer	EDTA	250mM	9,305g
	Sarcosyl	1 %	1g
	pH 9 eingestellt mit NaOH		auf 100ml A. bidest
Enzympuffer für SmaI	NE Buffer 41 (10 x konz.)		Auf 1x mit A. bidest

1

NEW

ENGLAND

BioLabs®Inc

3.6 Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation

Sämtliche Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert und in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Überblick über Sequenzen und Spezifitäten sämtlicher in der Arbeit verwendeter Oligonukleotid-Primer

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Amplifikat / Zielregion	Lokalisation/Bedeutung	Referenz
<i>nuc1</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT	367 bp, (F) <i>S. aureus</i>	Nuklease	Merlino et al. 2002 ¹
<i>nuc2</i>	AGCCAAAGCCTTGACGAACTAAAGC	367 bp, (R) <i>S. aureus</i>	Nuklease	Merlino et al. 2002 ¹
<i>S. intermedius</i> F	CCGTATTAGCTAGTTGGTGG	901bp (F)	16S rDNA	Wakita et al. 2002 ²
<i>S. intermedius</i> R	GAATGATGGCAACTAAGTTC	901bp (R)	16S rDNA	Wakita et al. 2002 ²
<i>mecA</i> F	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533 bp, <i>mecA</i> -Gen	SCC <i>mec</i>	Merlino et al. 2002 ¹
<i>mecA</i> R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533 bp, <i>mecA</i> -Gen	SCC <i>mec</i>	Merlino et al. 2002 ¹
CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495bp spezifisch für SCC <i>mec</i> -Typ I (F)	18398-18419	Oliveira et al. 2002 ³
CIF2 R2	ATTACCACAAGGACTACCAGC	495bp spezifisch für SCC <i>mec</i> -Typ I (R)	18892-18871	Oliveira et al. 2002 ³
KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284bp spezifisch für SCC <i>mec</i> -Typ II (F)	10445-10467	Oliveira et al. 2002 ³
KDP R1	CGAATGAAGTGAAAAGAAAGTGG	284bp spezifisch für SCC <i>mec</i> -Typ II (R)	10728-10707	Oliveira et al. 2002 ³

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Amplifikat / Zielregion	Lokalisation/Bedeutung	Referenz
MECI P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	209bp spezifisch für SCCmec-Typ II, III (F)	42428-42447	Oliveira et al. 2002 ³
MECI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	209bp spezifisch für SCCmec-Typ II, III (R)	42636-42617	Oliveira et al. 2002 ³
DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGTC	342bp spezifisch für SCCmec-Typ I,II,IV (F)	38011-37992	Oliveira et al. 2002 ³
DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG	342bp spezifisch für SCCmec-Typ I,II,IV (R)	37670-37689	Oliveira et al. 2002 ³
RIF4 F3	GTGATTGTCGAGATATGTGG	243bp spezifisch für SCCmec-Typ III (F)	45587-45607	Oliveira et al. 2002 ³
RIF4 R9	CGCTTATCTGTATCTATCGC	243bp spezifisch für SCCmec-Typ III (R)	45829-45809	Oliveira et al. 2002 ³
RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414bp spezifisch für SCCmec-Typ III (F)	59573-59594	Oliveira et al. 2002 ³
RIF5 R13	GTCACAGTAATCCATCAATGC	414bp spezifisch für SCCmec-Typ III (R)	59986-59965	Oliveira et al. 2002 ³
IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	381bp spezifisch für SCCmec-Typ Ia (F)	49963-49982	Oliveira et al. 2002 ³
pUB110 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC	381bp spezifisch für SCCmec-Typ Ia (R)	50343-50323	Oliveira et al. 2002 ³
IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	303bp spezifisch für SCCmec-Typ IIIa (F)	29654-29673	Oliveira et al. 2002 ³
pT181 R1	GAAGAATGGGAAAGCTTAC	303bp spezifisch für SCCmec-Typ IIIa (R)	29976-29956	Oliveira et al. 2002 ³

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Amplifikat / Zielregion	Lokalisation/Bedeutung	Referenz
MECA P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	162bp interne Kontrolle für <i>mecA</i> (F)	1190-1211	Oliveira et al. 2002 ³
MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG	162bp interne Kontrolle für <i>mecA</i> (R)	1351-1332	Oliveira et al. 2002 ³
<i>arc</i> -up	TTGATTCACCAGCGGTATTGTC	456bp Carbamat-Dehydrogenase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>arc</i> -down	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456bp Carbamat-Dehydrogenase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>aro</i> -up	ATCGGAAATCCTATTTCACATTC	456bp Shikimate- Dehydrogenase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>aro</i> -down	GGTGTGTATTAATAACGATATC	456bp Shikimate- Dehydrogenase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>glp</i> -up	CTAGGAACTGCAATCTTAATC	465bp Glycerol-Kinase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>glp</i> -down	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465bp Glycerol-Kinase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>gmk</i> -up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429bp Guanylat-Kinase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>gmk</i> -down	TCATTAAC TACAACGTAATCGTA	429bp Guanylat-Kinase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>pta</i> -up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474bp Phosphat-Acetyltransferase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>pta</i> -down	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	474bp Phosphat-Acetyltransferase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Amplifikat / Zielregion	Lokalisation/Bedeutung	Referenz
<i>tpi</i> -up	TCGTTCACTTCTGAACCGTCGTGAA	402bp Triosephosphat-Isomerase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>tpi</i> -down	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402bp Triosephosphat-Isomerase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>ypi</i> -up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516bp Acetyl-Coenzym-A-Transferase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
<i>ypi</i> -down	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516bp Acetyl-Coenzym-A-Transferase	konservatives Haushaltsgen	Enright et al. 2002 ⁴
PVL-F	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433bp PVL-Locus	exfoliatives Toxin	Lina et al. 1999 ⁵
PVL-R	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	433bp PVL-Locus	exfoliatives Toxin	Lina et al. 1999 ⁵

Merlino¹ (83), Wakita² (101), Oliveira³ (99), Enright⁴ (119), Lina⁵ (82)