

## 5 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Arbeit thematisch gegliedert dargestellt. Die Darstellung erfolgt in Analogie zu den vier Zielen dieser Arbeit.

Zunächst werden die Ergebnisse der Evaluierung praxisnaher phänotypischer Nachweisverfahren für MRSA in der Veterinärmedizin vorgestellt (5.1). Anschließend folgen unter Punkt 5.2 die Erkenntnisse zum Vorkommen, zur Typisierung bzw. Charakterisierung von MRSA bei Pferden (5.2.1) und Kleintieren (MRSA-Isolate aus Einsendungen von Untersuchungsämtern und anderen mikrobiologischen Instituten aus verschiedenen Bundesländern, 5.2.2).

Schließlich folgt eine umfassende Darstellung der Ergebnisse zu MRSA-Isolaten von allen Tieren, Menschen und Gegenständen, die in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin entstanden sind (5.2.3). Den Abschluss bilden die Einordnung sowie die Bewertung wesentlicher genetischer Charakteristika auf dem Hintergrund der weltweit bislang bekannten *S. aureus*-Population unter Berücksichtigung einiger häufig auftretenden humanen Epidemiestämme aus Deutschland im Vergleich zu den in dieser Arbeit dokumentierten MLST-Typen und PFGE-Mustern (5.2.4).

### 5.1 Evaluierung phänotypischer Nachweisverfahren für MRSA in der Veterinärmedizin

In diesem Kapitel werden die Resultate der Evaluierung phänotypischer Tests zur Identifizierung von MRSA für den veterinärmedizinischen Bereich dargestellt. Zunächst werden die Ergebnisse des Agardiffusionsverfahrens mit Oxacillin (1- und 5µg) und Cefoxitin (30µg) nach einer Inkubationszeit von 18h erläutert, im Anschluss dazu die Resultate des Screenings mittels Oxacillin-Agar. Die Resultate werden in Form einer Vier-Felder-Tafel vorgestellt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Resistenzbestimmungen wurden mit den PCR-Ergebnissen ("Goldstandard" zum Nachweis für MRSA) verglichen. Der positive (richtige!) Vorhersagewert (positive predictive value, ppv) gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass ein positives Testergebnis bei einem *mecA*-positivem *S. aureus* auftritt. Der negative Vorhersagewert (negative predictive value, npv) gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein negatives (richtiges!) Testergebnis bei einem MSSA eintritt.

Ergebnisse für das Agardiffusionsverfahren mit Oxacillin 1µg

Bei den 116 mittels Agardiffusion (Oxacillin, Cefoxitin) untersuchten *S. aureus*-Isolaten tierischer Herkunft ließ sich in 21 Fällen das für die Methicillinresistenz verantwortliche *mecA*-Gen durch PCR nachweisen.

**Tabelle 7a: Ergebnisse für das Agardiffusionsverfahren mit Oxacillin 1µg**

Oxacillin 1µg Resistenzlimit R ≤ 13mm	Tatsächlicher Sachverhalt		Insgesamt
	MRSA	MSSA ( <i>mecA</i> -negativ)	
Positiver Befund	A "richtig positiv": 19	B "falsch positiv": 18	A + B 37
Negativer Befund	C "falsch negativ": 2	D "richtig negativ": 77	C + D 79
Insgesamt	A + C 21	B + D 95	Summe 116

Oxacillin 1µg – Sensitivität:  $A / (A + C) = 19 / (19 + 2) = 0,905$

Oxacillin 1µg – Spezifität:  $D / (D + B) = 77 / (18 + 77) = 0,811$

ppv = P (MRSA-positiv/ Test positiv) =  $A / (A + B) = 0,513$

npv = P (MRSA-negativ/ Test negativ) =  $D / (C + D) = 0,975$

Das "Detektionsvermögen" (Sensitivität) von Oxacillin 1µg entspricht 0,905, während die Richtigkeit der negativen Aussage (Spezifität) nur bei 0,811 liegt. Tatsächlich sind mit dieser Methode 18 MSSA von 95 Testisolaten fälschlich als MRSA klassifiziert worden, während 2 (von 21) MRSA nicht als solche erkannt wurden. 20 von 116 Testisolaten sind demnach falsch beurteilt worden, dies entspricht einer Fehlerquote von ca. 17,2%. Grafische Darstellung: Abbildung 2.

**Tabelle 7b: Ergebnisse für das Agardiffusionsverfahren mit Oxacillin 5µg**

Oxacillin 5µg Resistenzlimit: R ≤ 20mm	Tatsächlicher Sachverhalt		Insgesamt
	MRSA	MSSA ( <i>mecA</i> -negativ)	
Positiver Befund	A "richtig positiv": 18	B "falsch positiv": 4	A + B 22
Negativer Befund	C "falsch negativ": 3	D "richtig negativ": 91	C + D 94
Insgesamt	A + C 21	B + D 95	Summe 116

Oxacillin 5µg-Sensitivität:  $A / (A + C) = 18 / (18 + 3) = 0,857$

Oxacillin 5µg-Spezifität:  $D / (D + B) = 91 / (91 + 4) = 0,958$

ppv = P (MRSA-positiv/ Test positiv) =  $A / (A + B) = 0,818$

npv = P (MRSA-negativ/ Test negativ) =  $D / (C + D) = 0,968$

Die Sensitivität von Oxacillin 5µg entspricht 0,857, während die Spezifität bei 0,958 liegt. Tatsächlich sind mit dieser Methode 4 MSSA von 95 Testisolaten fälschlich als MRSA klassifiziert worden, während 3 (von 21) MRSA nicht als solche erkannt wurden. Sieben von 116 Testisolaten sind demnach falsch beurteilt worden, dies entspricht einem Fehler von ca. 6,0%. Grafische Darstellung: Abbildung 3.

## 5.1.1 Ergebnisse für das Agardiffusionsverfahren mit Cefoxitin 30µg

Tabelle 7c: Ergebnisse für das Agardiffusionsverfahren mit Cefoxitin 30µg

Cefoxitin 30 µg Resistenzlimit: R ≤ 20mm	Tatsächlicher Sachverhalt		Insgesamt
	MRSA	MSSA (mecA-negativ)	
Positiver Befund	A "richtig positiv": 19	B "falsch positiv": 1	A + B 20
Negativer Befund	C "falsch negativ": 2	D "richtig negativ": 94	C + D 96
Insgesamt	A + C 21	B + D 95	Summe 116

Cefoxitin 30µg-Sensitivität:  $A / (A + C) = 19 / (19 + 2) = 0,905$

Cefoxitin 30µg-Spezifität:  $D / (D + B) = 94 / (94 + 1) = 0,989$

ppv= P (MRSA-positiv/ Test positiv) =  $A/(A+B) = 0,95$

npv= P (MRSA-negativ/ Test negativ) =  $D/(C+D) = 0,979$

Der Einsatz von Cefoxitin 30µg erzielt im Agardiffusionsverfahren eine Sensitivität von 0,905, während die Richtigkeit der negativen Aussage (Spezifität) bei 0,999 liegt. Mit dieser Methode ist ein MSSA von 95 Testisolaten fälschlich als MRSA klassifiziert worden, während 2 (von 21) MRSA nicht als solche erkannt worden sind. Drei von 116 Testisolaten sind demnach falsch beurteilt worden, dies entspricht einem Fehler von ca. 2,6% (Abbildung 4).

Durch eine Anhebung des Resistenzlimits auf ≤ 23mm kann man eine Sensitivität von 1 und eine Spezifität von 0,958 erzielen (gestrichelte Linie in Abbildung 4). Dies entspricht einer Fehlerquote von 3,4%. (Abbildung 4)

Tabelle 7d: Ergebnisse für das Agardiffusionsverfahren mit Oxacillin 5µg

Cefoxitin 30µg Resistenzlimit R ≤ 23mm	Tatsächlicher Sachverhalt		Insgesamt
	MRSA	MSSA (mecA-negativ)	
Positiver Befund	A "richtig positiv": 21	B "falsch positiv": 4	A + B 25
Negativer Befund	C "falsch negativ": 0	D "richtig negativ": 91	C + D 91
Insgesamt	A + C 21	B + D 95	Summe 116

Cefoxitin 30µg-Sensitivität:  $A / (A + C) = 21 / (21 + 0) = 1$

Cefoxitin 30µg-Spezifität:  $D / (D + B) = 91 / (91 + 4) = 0,958$

ppv= P (MRSA-positiv/ Test positiv) =  $A/(A+B) = 0,84$

npv= P (MRSA-negativ/ Test negativ) =  $D/(C+D) = 1$

## 5.1.2 Ergebnisse des Agardiffusionsverfahrens mit dem Kontrollstamm

Tabelle 8: Hemmhofdurchmesser für Kontrollstamm DSMZ 4910

Stamm	Antibiotikum	Anzahl der Tests	Mittelwert (mm)*
<i>S. aureus</i> DSMZ 4910	Oxacillin 1 µg	20	16,2 (16 – 20)
<i>S. aureus</i> DSMZ 4910	Oxacillin 5 µg	20	23,1 (19 – 25)
<i>S. aureus</i> DSMZ 4910	Cefoxitin 30 µg	20	29,1 (27 – 35)

Die Ablesung wurde stets durch die gleiche Person vorgenommen.

\*niedrigster und höchster ermittelter Hemmhofdurchmesser

## 5.1.3 MRSA-Diagnostik mittels Oxacillin-Screening Agar

Von 57 mit dieser Methode untersuchten *S. aureus*- Stämmen (6 MRSA und 51 MSSA) zeigte ein MSSA zartes Wachstum nach 24h bei einer Inkubationstemperatur von 30°C und 2 bei einer Temperatur von 37°C. Alle MRSA zeigten auf diesem Medium temperaturunabhängig Wachstum nach 24h. Allein die Praktikabilität dieser Methode erwies sich als unzulänglich, da definitionsgemäß bei einem positiven Ergebnis Wachstum mit bloßem Auge zu erkennen sein soll. Diese Methode beruht demnach sehr stark auf dem Sehvermögen des Untersuchenden und führt auch nach längerer Praxis zu Unsicherheiten und wurde aus diesem Grunde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Tabelle 9: MSSA- / MRSA Wachstum auf Oxacillin-Screening Agar 30°C

Oxacillin-Screening-Agar Inkubation 30°/24h	Tatsächlicher Sachverhalt		Insgesamt
	MRSA	MSSA (mecA-negativ)	
Positiver Befund (Wachstum)	A "richtig positiv": 15	B "falsch positiv": 1	A + B 16
Negativer Befund (kein Wachstum)	C "falsch negativ": 0	D "richtig negativ": 50	C + D 50
Insgesamt	A + C 15	B + D 51	Summe 66

OSA-Sensitivität (30°/24h):  $A / (A + C) = 15 / (15 + 0) = 1$

OSA- Spezifität (30°/24h):  $D / (D + B) = 50 / (50 + 1) = 0,98$

ppv= P (MRSA-positiv/ Test positive) =  $A/(A+B) = 0,938$

npv= P (MRSA-negativ/ Test negativ) =  $D/(C+D) = 1$

**Tabelle 10: MSSA- / MRSA-Wachstum auf Oxacillin-Screening Agar 37°C**

Oxacillin-Screening-Agar Inkubation 37°/24h	Tatsächlicher Sachverhalt		Insgesamt
	MRSA	MSSA (mecA-negativ)	
Positiver Befund (Wachstum)	A "richtig positiv": 15	B "falsch positiv": 2	A + B 17
Negativer Befund (kein Wachstum)	C "falsch negativ": 0	D "richtig negativ": 49	C + D 49
Insgesamt	A + C 15	B + D 51	Summe 66

OSA-Sensitivität (37°/24h):  $A / (A + C) = 15 / (15 + 0) = 1$

OSA-Spezifität (37°/24h):  $D / (D + B) = 49 / (49 + 2) = 0,96$

ppv = P (MRSA-positiv/ Test positiv) =  $A / (A + B) = 0,882$

npv = P (MRSA-negativ/ Test negativ) =  $D / (C + D) = 1$

### 5.1.4 Vergleich phänotypischer Nachweise für MRSA

Wie die Tabelle 11 sowie die nachfolgenden Abbildungen (2, 3, 4) zeigen, ist Oxacillin als Wirkstoff im Agardiffusionsverfahren den diskriminierenden Eigenschaften von Cefoxitin in allen Bereichen (Spezifität, Sensitivität, ppv, npv) unterlegen. Die positiven Ergebnisse im tabellarischen Vergleich mit dem Oxacillin-Screening-Agar sollten jedoch kritisch im Hinblick auf die Praktikabilität dieser Methode gesehen werden.

**Abbildung 2: Hemmhöfe im Filterplättchendiffusionstest mit Oxacillin (1µg)**

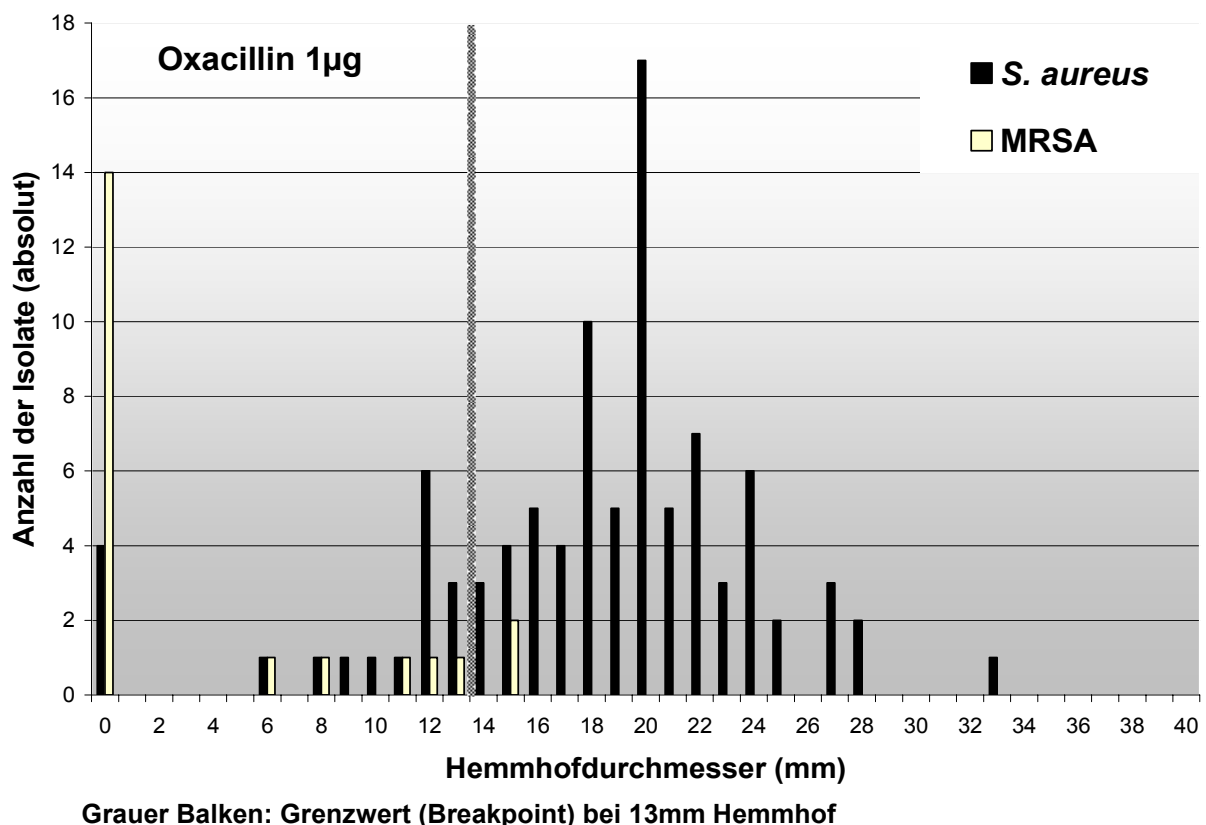


Abbildung 3: Hemmhöfe im Filterplättchendiffusionstest mit Oxacillin (5µg)

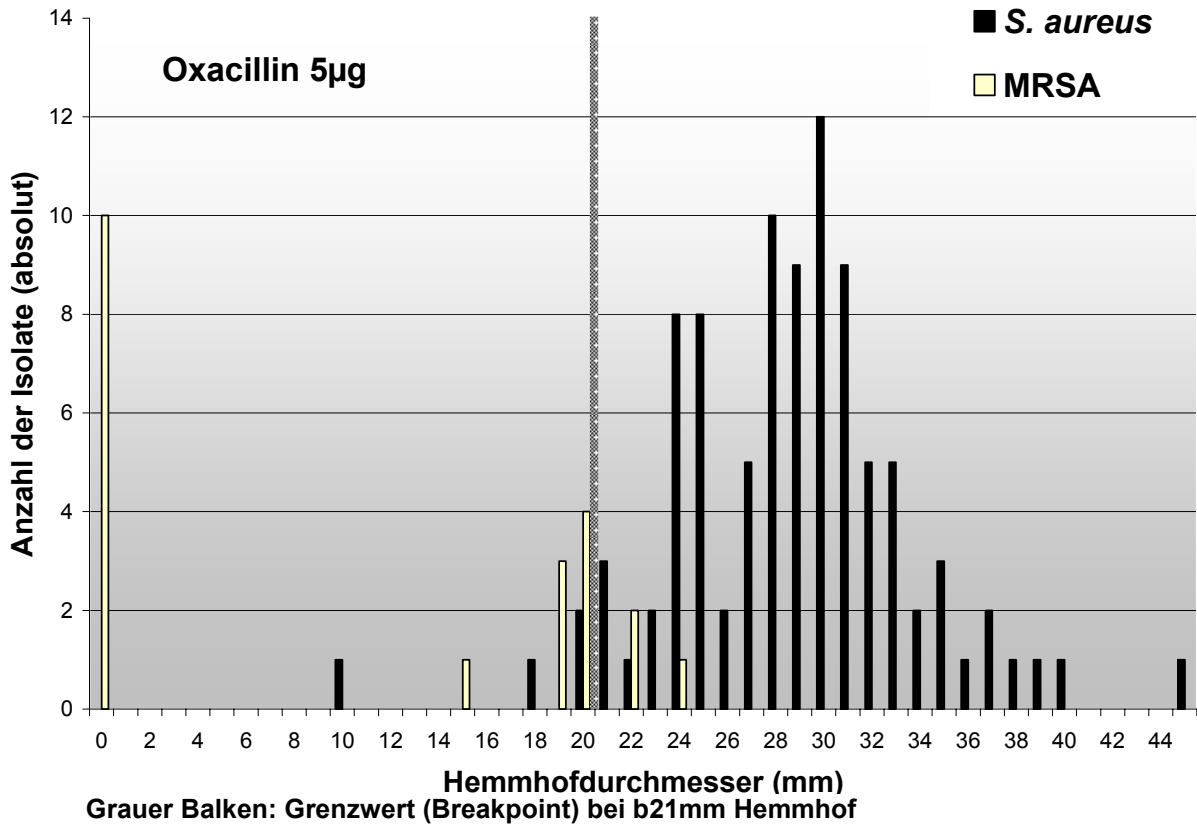
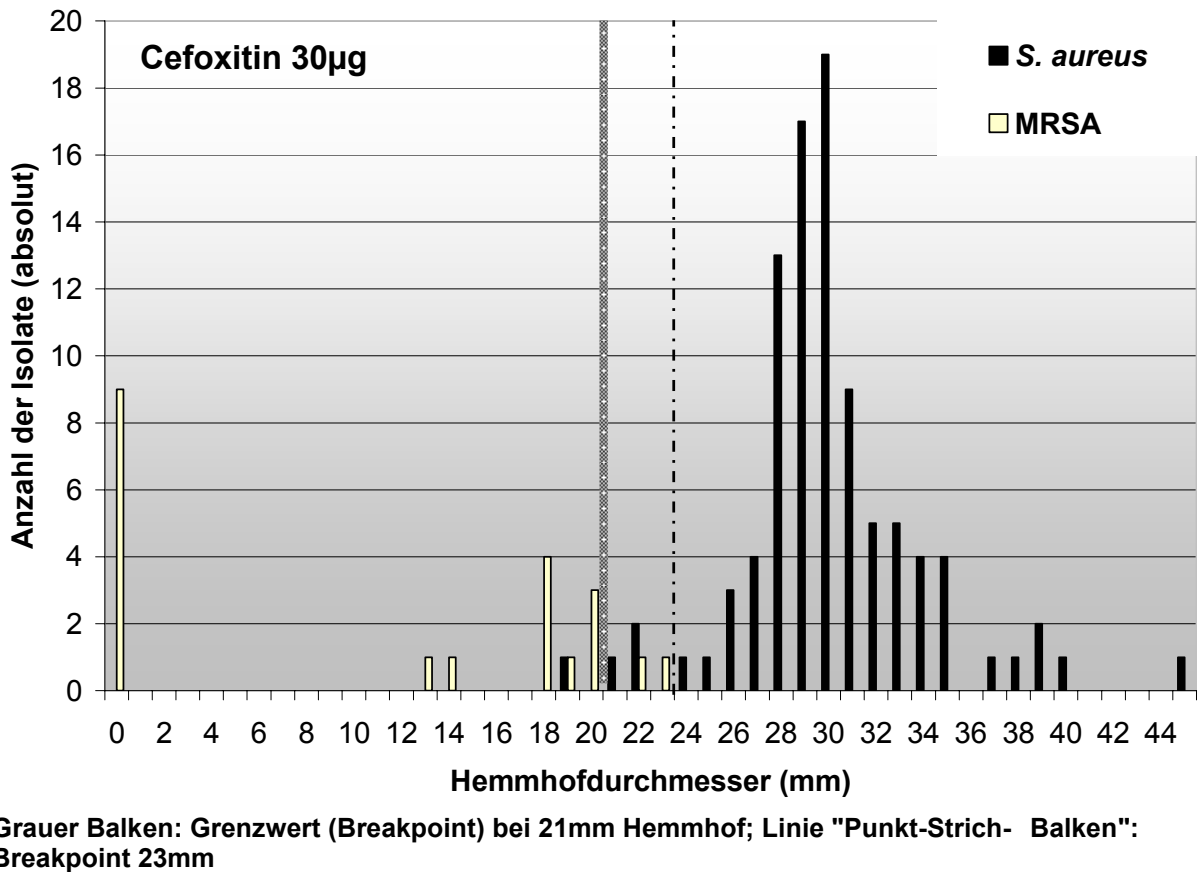


Abbildung 4: Hemmhöfe im Filterplättchendiffusionstest mit Cefoxitin (30µg)



**Tabelle 11: Vergleich der phänotypischen Testmethoden zum Nachweis von MRSA**

Test	Ergebnis			
	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	ppv(%)	npv(%)
Oxacillin 1µg	91	81	51	98
Oxacillin 5µg	86	96	82	97
Cefoxitin 30µg <sup>1</sup>	90	98	95	98
Cefoxitin 30µg <sup>2</sup>	100	96	84	100
OSA 30°C	100	98	94	100
OSA 37°C	100	96	88	100

Vergleichende Gegenüberstellung phänotypischer Nachweismethoden für MRSA: Erzielte Ergebnisse für Sensitivität, Spezifität sowie des positiven (ppv) und negativen (npv) Vorhersagewertes der jeweiligen Methode. Als jeweils 100% ("Goldstandard") wird der Nachweis des *mecA*-Gens durch PCR herangezogen.

### Evaluierung einer Triplex PCR zum zeitgleichen Nachweis von *S. aureus*, *S. intermedius* sowie des *mecA*-Gens

Durch Erweiterung der von Merlino et al. (2002) (83) beschriebenen PCR zum Nachweis von *S. aureus* und des *mecA*-Gens durch die von Wakita et al. (2002) (101) als speziesspezifisch für *S. intermedius* beschriebene Sequenzen der 16S RNA für *S. intermedius* ist es gelungen, alle drei Nachweise (*S. aureus*, *S. intermedius*, *mecA*) in einer PCR führen zu können (siehe: Abbildung 5). Insgesamt wurde die Aussagefähigkeit dieser PCR durch 200 Isolate (Tabelle 12) überprüft. Verglichen wurden die erzielten Resultate zur Ermittlung der Richtigkeit mit den phänotypischen Ergebnissen.

**Tabelle 12: PCR-Ergebnisse von 200 *Staphylococcus spp.* in der Triplex-PCR.**

Spezies	Anzahl*	PCR-Ergebnis	
		Richtig (%)	Falsch (%)
MSSA	100	100 (100)	0 (100)
MRSA	50	50 (100)	0 (100)
<i>S. intermedius</i>	50	50 (100)	0 (100)

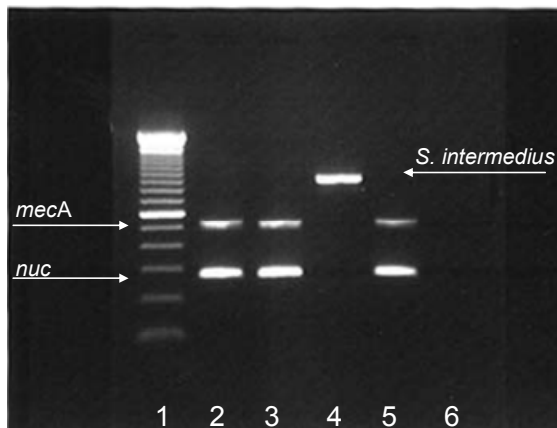
\*: Anzahl unterschiedlicher Isolate

### Beispiel für die Triplex-PCR

Die folgende Abbildung 5 ist ein repräsentatives Bild der Triplex-PCR, die für die Unterscheidung der koagulasepositiven Spezies *S. aureus* und *S. intermedius* sowie für den gleichzeitigen Nachweis der resistenzvermittelnden Determinante *mecA* eingesetzt wurde. Einschränkung bleibt an dieser Stelle zu erwähnen, dass nur phänotypisch vordifferenzierte *S. intermedius* in dieser PCR immer ein positives Signal ergaben, das gleiche Signal aber bei

weiteren Untersuchungen auch z.T. von KNS zu erhalten war. So kann man zusammenfassen, dass diese Triplex-PCR geeignet ist, koagulasepositive Spezies wie MRSA, MSSA und MSSI sowie MRSI zu unterscheiden, im Falle von *S. intermedius* (MSSI, MRSI) aber kein spezies-spezifisches Signal zu erwarten ist, da sich im Laufe der Untersuchungen gezeigt hat, dass auch KNS z.T. ein ähnliches Signal produzieren können. Der eindeutige Nachweis für *S. intermedius* gilt nur in Verbindung mit einem phänotypischen Nachweisverfahren wie dem Nachweis der Plasmakoagulase sowie dem Test auf anaerobe Mannitverwertung (siehe auch Tabelle 5).

**Abbildung 5: Beispielhaftes Elektropherogramm der hier eingesetzten Triplex-PCR**



- Reihe 1: 100bp Marker
- Reihe 2: MRSA
- Reihe 3: MRSA
- Reihe 4: *S.intermedius* (IMT-6689-03)
- Reihe 5: Barnimer Epidemiestamm (MRSA)
- Reihe 6: dest. H<sub>2</sub>O

Mit der Triplex-PCR können drei Gene nachgewiesen werden: Auf der Höhe von 367bp ist im positiven Fall die "nuc"-Bande (spezifisch für *S. aureus*) zu sehen, bei 533bp die *mecA*-Bande ( $\beta$ -Lactamresistenz) und bei 967bp die Bande für den *S. intermedius*-Nachweis

## 5.2 Vorkommen sowie Charakterisierung des Geno- und Phänotyps von MRSA-Isolaten

### Gesamtanzahl der Staphylokokken sowie der nachweislichen MRSA und Methicillin-sensiblen *S. intermedius* (MSSI) von Tieren, Menschen und Gegenständen (herkunftsunabhängig)

1544 Einzelproben (davon 144 vordifferenzierte Keimisolate aus anderen veterinärmedizinischen diagnostischen Laboren) von Tieren, Menschen und Gegenständen sind in dieser Arbeit untersucht worden. Da die Anzahl der in einer klinischen Probe vorkommenden Staphylokokken-Spezies zwischen null und drei schwankte, beträgt die Gesamtzahl der untersuchten Staphylokokken-Isolate 1023 (Tabelle 13).

In 320 Fällen wurde *S. aureus* isoliert, dabei konnten 89mal die Diagnose MRSA gestellt werden. In 12 dieser Fälle handelte es sich um eine zweite positive Probe eines Tieres, das bereits zuvor einen MRSA-positiven Befund hatte. 54 Nachweise gelangen bei Tieren, 20 Isolate stammten von Menschen und in drei Fällen wurden MRSA von Gegenständen isoliert. Ferner wurden 219 *S. intermedius* (Methicillin-sensible *S. intermedius*; MSSI) nachgewiesen, keines der Isolate besaß ein *mecA*-Gen.

Insgesamt wurden 419 *mecA*-negative koagulase-negative Staphylokokken (KNS) sowie 65 *mecA*-positive KNS nachgewiesen.

Eine Gesamtübersicht der in dieser Arbeit typisierten *Staphylococcus spp.* bietet Tabelle 13, ausdrücklich beziehen sich diese Ergebnisse jedoch nur auf das willkürlich zusammengetragene Probenkonvolut, es handelt sich nicht um eine repräsentative Probe. Aus diesem Grunde wurde auf Prozentangaben in der Übersichtsdarstellung verzichtet. Es soll lediglich



Ausmaß und Anzahl der für die jeweiligen Spezies durchgeführten Untersuchungen übersichtlich dargestellt werden.

**Tabelle 13: Übersicht über das Vorkommen des *mecA*-Gens bei *Staphylococcus spp.* in dieser Arbeit**

Probenherkunft	Gesamtanzahl untersuchter Isolate	MRSA	MSSA	MSSI	KNS ( <i>mecA</i> -neg.)	KNS ( <i>mecA</i> -pos.)
Hund	487	40 <sup>1</sup>	47	176	202	22
Mensch	234	20 <sup>2</sup>	57	8	118	31
Pferd	135	13	57	16	42	7
Katze	46	5	24	3	14	0
Gegenstände	25	3	0	6	16	0
Rind	20	0	4	1	13	2
unbek. Tierart	19	0	13	5	1	0
Maus	14	0	12	0	2	0
Vogel	9	2	2	3	2	0
Kaninchen	7	2	3	0	2	0
Schwein	6	0	3	0	2	1
Meerschwein	5	2 <sup>3</sup>	2	0	1	0
Ratte	5	0	2	0	2	1
Ziege	3	0	1	0	1	1
Affe	3	0	2	1	0	0
Schaf	1	0	1	0	0	0
Tamandua	1	0	1	0	0	0
Hirsch	1	0	0	0	1	0
Fledermaus	1	1	0	0	0	0
Schildkröte	1	1	0	0	0	0
<b>Summe</b>	<b>1023</b>	<b>89</b>	<b>231</b>	<b>219</b>	<b>419</b>	<b>65</b>

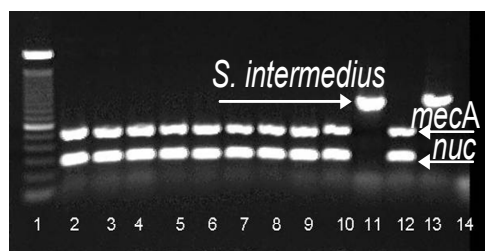
MRSA: Methicillin-resistente *S. aureus*; MSSA: Methicillin-sensible *S. aureus*; MSSI: Methicillin-sensible *S. intermedius*; KNS: Koagulase-negative Staphylokokken (KNS); *mecA*:  $\beta$ -Lactam-Resistenzgen

<sup>1</sup>davon 7 Wiederholungsuntersuchungen; <sup>2</sup>davon 2 Wiederholungsuntersuchungen; <sup>3</sup>davon 1 Wiederholungsuntersuchung

## 5.2.1 MRSA-Isolate von Pferden

Aus 135 untersuchten Pferde-Isolaten, die in den Jahren 2002 bis 2004 aus ganz Deutschland eingesendet wurden, konnten 70 *S. aureus* auf das Vorhandensein einer *mecA*-kodierten Methicillinresistenz durch PCR geprüft werden. Ein Beispiel für den MRSA- und MSSI-Nachweis durch Triplex-PCR bei Pferden bietet Abbildung 6. In 11 Fällen (15,7%) wurde der MRSA-Nachweis erbracht, bei 2 Tieren wurde auch in einer Wiederholungsuntersuchung erneut MRSA gefunden (siehe auch Tabelle 14).

**Abbildung 6: Beispielhafte Anwendung der Triplex-PCR bei *S. aureus*-Isolaten von Pferden**



- Reihe 1 100bp Marker
- Reihe 2-10 equine MRSA-Isolate
- Reihe 11 *S. intermedius*-positiv Kontrolle (IMT-6689-02)
- Reihe 12 MRSA-positiv Kontrolle (Bamimer Epidemiestamm)
- Reihe 14 dest. H<sub>2</sub>O

**Elektropherogramm: MRSA-Nachweise durch die 367bp-Bande (*nuc*-Gen), Nachweis der 533bp-Bande (*mecA*-Gen). Die 967bp-Bande dient dem *S. intermedius*-Speziesnachweis. MRSA-Nachweis erbracht (Reihe 2-10) durch Speziesnachweis (*nuc*) und Resistenznachweis (*mecA*)**

**Tabelle 14: MRSA-Isolate von Pferden**

Datum	Stamm (Bezeichnung)	Isolationsort	Herkunft (Bundesland)
13.12.2002	IMT-2223-02	Wunde	Berlin/ Brandenburg
20.12.2002	IMT-2254-02	unbekannt	Berlin/ Brandenburg
2002**	G10,5439-02	Nase	Hessen
2002**	G12,5685-02	Samenstrangfistel	Hessen
11.07.2003	IMT-1691-03	Wunde	Berlin/ Brandenburg
04.07.2003	IMT-2480-03	Wunde	Bayern
01.09.2003	IMT-2484-03	Peritonitis	Bayern
2003**	IMT-1359-03	Mastitis	Hessen
28.05.2004	IMT-1079-04	Wunde	Berlin/ Brandenburg
16.07.2004	IMT-1374-04	Wunde	Berlin/ Brandenburg
22.12.2004	IMT-2176-04*	Wunde	Berlin/ Brandenburg

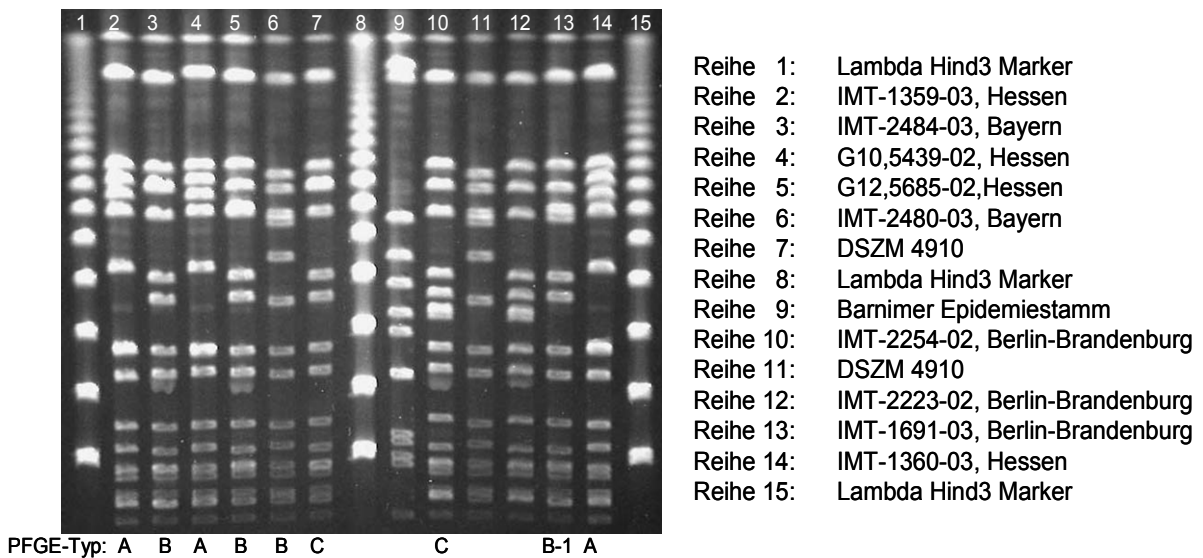
\*wiederholt positiver Befund im 2. Tupfer; \*\* exaktes Isolierungsdatum unbekannt

## PFGE-Analyse der MRSA-Isolate von Pferden

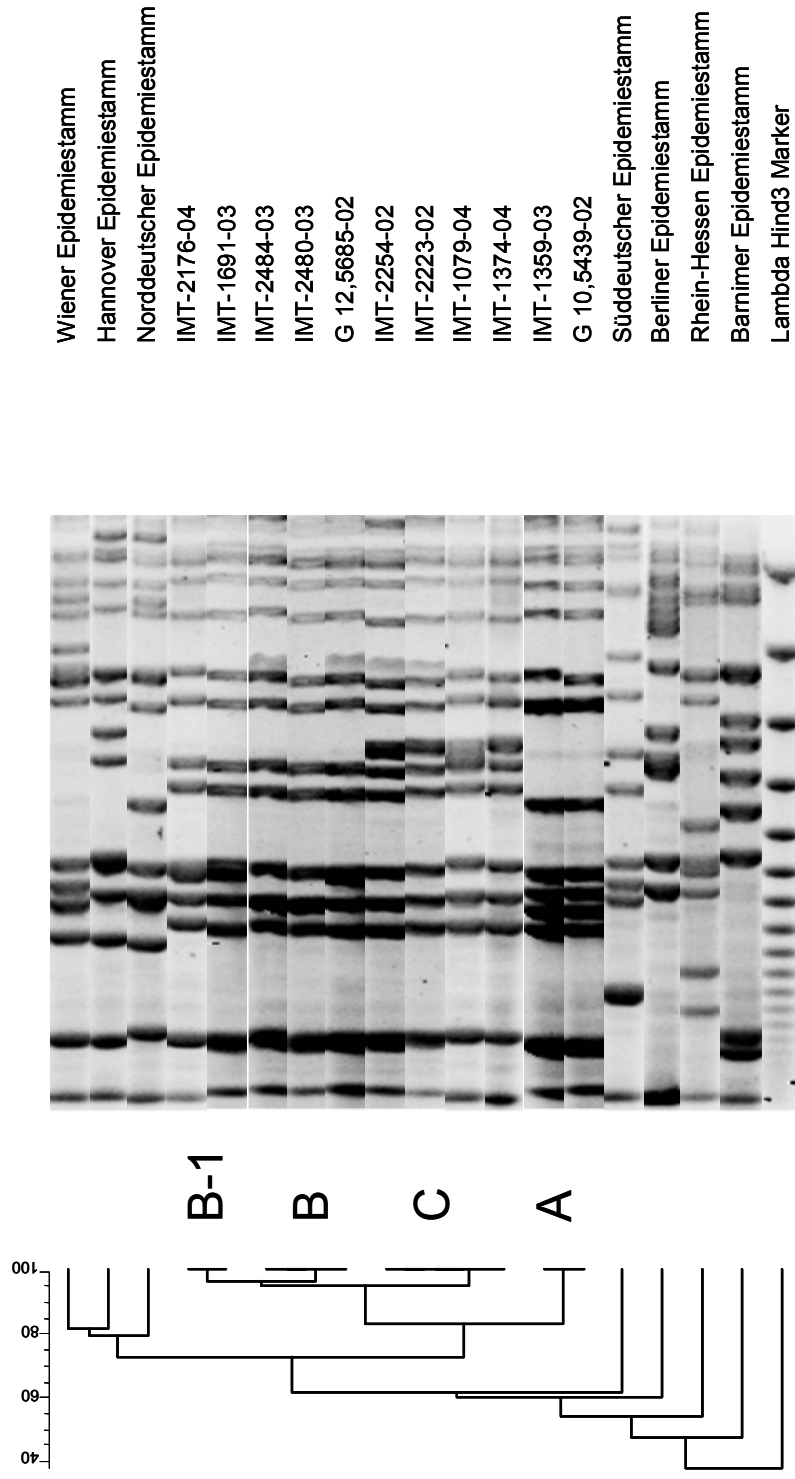
Bei den untersuchten MRSA-Isolaten von Pferden konnten visuell 3 unterschiedliche PFGE-Muster nachgewiesen werden (Abbildung 7). Muster A wurde nur bei 2 Isolaten aus Hessen gefunden, Muster B bei 2 Isolaten aus Bayern sowie bei einem Isolat aus Hessen und Muster B-1 bei einem Isolat aus der Region Berlin-Brandenburg. Muster C wurde bei 2 Tieren aus Berlin nachgewiesen. Von den Isolaten mit der Bezeichnung IMT-2480-03 und IMT-2484-03 (PFGE-Muster B) ist bekannt, dass sie zur gleichen Zeit in einer bayerischen Tierklinik in Behandlung waren. Das Isolat IMT-1359-03 stammt von einem Pferd, welches aufgrund einer

Mastitis in einer hessischen Tierklinik behandelt wurde. Die Isolate IMT-2223-02 und IMT-2254-02 (PFGE Muster C) stammen von unterschiedlichen Tieren aus einer Pferdeklinik im Raum Berlin/Brandenburg, die in engem zeitlichen Zusammenhang dort als Patienten eingestellt waren. Nur von IMT-2223-02 ist bekannt, dass der Tupfer aus einer Wundheilungsstörung stammt. Die oben beschriebenen PFGE-Muster wurden im Anschluss an die visuelle Auswertung mit dem Analyseprogramm Gel-Compar II auf genotypische Ähnlichkeit untersucht (Abbildung 7) und die bisher gewonnenen Ergebnisse bestätigt. Darüber hinaus lässt sich feststellen, dass alle PFGE-Muster in dieser Analyse eine ca. 86-prozentige Übereinstimmung aufweisen (Abbildung 8).

**Abbildung 7: Beispielhaftes Elektropherogramm der genomischen Makrorestriktion mittels Endonuklease *Sma*I: PFGE-Muster von equinen MRSA-Isolaten**



**Abbildung 8: PFGE-Muster aller MRSA-Isolate von Pferden aus dieser Arbeit im Vergleich zu humanen (deutschen) Epidemiestämmen**



PFGE-Muster equiner MRSA-Isolate ("A"- "C"): deutlich zu erkennen die große Ähnlichkeit der PFGE-Muster, die auf eine enge genetische Beziehung hinweist (über 80%); dagegen keine besondere auffällige Ähnlichkeit zu PFGE-Mustern von humanen Epidemiestämmen

## MLST-Analyse der equinen MRSA-Isolate:

Um den Sequenztyp (ST) der einzelnen PFGE-Typenstämme zu ermitteln, wurden zunächst sieben konservierte Haushaltsgene partiell in Einzel-PCRs amplifiziert. Das anschließend zur Verfügung stehende DNS-Material wurde von kommerzieller Seite sequenzanalysiert. Die Gensequenzen ermöglichen einen Online-Abgleich mit einer umfangreichen Datenbank (www.mlst.net). Aus der Zusammensetzung der so ermittelten sieben Allele lässt sich der ST eindeutig zuordnen.

**Abbildung 9: Beispielhaftes Elektropherogramm für die Amplifikate der 7 für die MLST vorgesehenen Gene**



### Amplifikate der für die Sequenzanalyse (MLST) vorgesehenen sieben Gene (Reihen 2-8)

Bei den in dieser Arbeit mittels MLST untersuchten MRSA-Stämmen von Pferden wurden zwei STen gefunden, ST254 und ST8 (siehe Tabelle 15).

All jene Stämme, die bereits durch PFGE-Analyse eindeutig einem STen zuzuordnen waren, wurden dem kostenintensiveren MLST-Verfahren nicht unterzogen, da in diesen Fällen bei gleichem PFGE-Muster (Feintypisierung) kaum Abweichungen in der MLST zu erwarten waren.

**Tabelle 15: Mittels MLST definierte Sequenztypen der equinen MRSA-Isolate**

Stamm-Bezeichnung	Alleltyp	Sequenztyp (ST)	PFGE-Typ
IMT-2223-02	3-32-1-1-4-4-3	254	C
IMT-2254-02	n.t.	n.t.	C
G10,5439-02	3-3-1-1-4-4-3	8	A
G12,5685-02	3-32-1-1-4-4-3	254	B
IMT-1691-03	3-32-1-1-4-4-3	254	B-1
IMT-2480-03	3-32-1-1-4-4-3	254	B
IMT-2484-03	n.t.	n.t.	B
IMT-1359-03	3-3-1-1-4-4-3	8	A
IMT-1079-04	n.t.	n.t.	C
IMT-1374-04	n.t.	n.t.	C
IMT-2176-04	n.t.	n.t.	B-1

n.t.: nicht getestet: Gleiche PFGE-Typen (siehe rechte Spalte) sind aus Kostengründen nicht sequenzanalysiert worden

ST254 und ST8 sind Genotyplinien aus dem selben klonalen Komplex (CC) mit der Bezeichnung CC8 (119). Sie differieren lediglich im *aroE*-Allel, und zwar lediglich in einer Base (Position 15, G/A) des insgesamt 456bp langen DNS-Fragmentes:

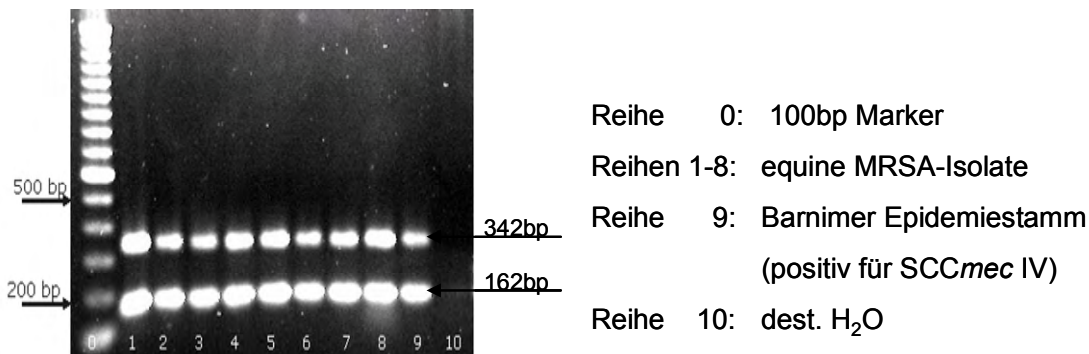
bp	1				5				10				15			
ST254	A	A	T	T	T	T	A	A	T	T	C	T	T	T	<b>G</b>	G
ST8	A	A	T	T	T	T	A	A	T	T	C	T	T	T	<b>A</b>	G

Anfangssequenz des Genes *aroE*: Nukleotid-Unterschied in Position 15 (bp: Basenpaare, ST: Sequenztyp), Bp-Position entspricht der Position im amplifizierten Fragment

## SCCmec-Typisierung equiner MRSA-Isolate

Die Multiplex-PCR zur Bestimmung des Genkassetten-typen (*SCCmec*) ergab bei allen von Pferden stammenden MRSA-Isolaten identische Ergebnisse. Neben der 162bp-Kontrollbande für das *mecA*-Gen ist das für den Kassetten-typ IV beschriebene 342bp Amplifikat nachgewiesen worden:

**Abbildung 10: Elektropherogramm von Amplifikaten für den Nachweis von SCCmecIV bei equinen MRSA-Isolaten**



**SCCmec IV: Nachweis des Genkassetten-typen (*SCCmec*) durch Amplifikation der 162bp-Bande (Nachweis von *mecA*) und der 342bp-Bande für Locus D (=IV) nach Oliveira et al. (2002)**

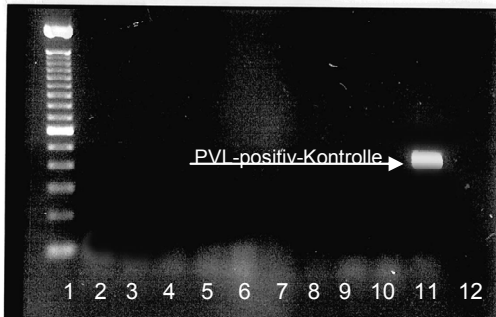
## Spa-Typisierung equiner MRSA-Isolate

Die hypervariable X-Region des *Spa*-Gens, welches für das Staphylokokken-Protein A kodiert, wird mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenzanalysiert. Aus der Anordnung der spezifischen Wiederholungssequenzen ergibt sich der jeweilige *Spa*-Typ. In Zusammenarbeit mit Dr. A. W. Friedrich vom Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster wurden die von Pferden stammenden MRSA-Isolate *spa*-typisiert. Dabei konnten drei verschiedene *Spa*-Typen (Typ 9, Typ 36, Typ 64) festgestellt werden. Die Typen 9 und 36 fanden sich im gleichen Sequenztyp, namentlich ST254, während *Spa*-Typ 64 im ST8 nachgewiesen wurde (für eine vergleichende Übersicht siehe Tabelle 16).

## Panton-Valentine-Leukozidine Gene

Bei keinem vom Pferd stammenden MRSA-Isolat ließen sich PVL-Gene nachweisen.

**Abbildung 11: Beispielhaftes Elektropherogramm für den Nachweis von PVL-Genen**



- Reihe 1: 100bp Marker
- Reihen 2-10: equine MRSA-Isolate
- Reihe 11: *S. aureus*- Kontrollstamm  
(positiv für PVL)
- Reihe 12: dest. H<sub>2</sub>O

Reihe 11: Positiver- (433bp) Nachweis (Kontrollstamm IMT-642-05). Reihen 2-10: PVL-negative MRSA-Isolate von Pferden

### **Ergebnis der Resistenzbestimmung gegenüber nicht $\beta$ -Lactam-Antiinfektiva bei equinen MRSA-Isolaten im Vergleich zu PFGE-Muster, MLST-Typ und SCCmec-Typ und Spa-Typ**

Das Ergebnis der Resistenzbestimmung im Agardiffusionsverfahren gegenüber nicht  $\beta$ -Lactam-Antiinfektiva ist in Tabelle 16 dargestellt.

Bis auf zwei geringfügige Abweichungen (Doxycyclin sensibel bei IMT-1359-03 sowie intermediär bei G10,5439-02) entsprechen die ermittelten Resistenzmuster der getesteten Isolate den durch Makrorestriktion mit anschließender Pulsfeld-Gelelektrophorese ermittelten PFGE-Typen, den MLST-Typen, dem SCCmec-Typ sowie dem ermittelten Spa-Typ. Eine Gesamtübersicht aller Ergebnisse bietet ebenfalls Tabelle 16.

Tabelle 16: Übersicht über alle MRSA-Isolate von Pferden und ihre Phäno- und Genotypischen Eigenschaften

Stamm Bezeichnung	Region	Bezeichnung (ST-MRSA-SCCmec)	PFGE-Typ	PVL-Gene	C	Dox	Ery	Gm	Enr	S	Sxt	Tet	Spa-Typ
G10,5439-02	Hessen	ST8-MRSA-IV	A	neg.	S	I	R	S	S	S	R	R	64
IMT-1359-03	Hessen	ST8-MRSA-IV	A	neg.	S	S	R	S	S	S	R	R	64
G12,5685-02	Hessen	ST254-MRSA-IV	B	neg.	S	I	S	R	R	R	R	R	36
IMT-1691-03	Berlin-Brandenburg	ST254-MRSA-IV	B-1	neg.	S	I	S	R	R	R	R	R	36
IMT-2480-03	Bayern	ST254-MRSA-IV	B	neg.	S	I	S	R	R	R	R	R	9
IMT-2484-03	Bayern	n.t.	B	neg.	S	I	S	R	R	R	R	R	9
IMT-2176-04	Berlin-Brandenburg	n.t.	B-1	neg.	S	I	S	R	R	R	R	R	36
IMT-2223-02	Berlin-Brandenburg	ST254-MRSA-IV	C	neg.	S	I	S	R	R	R	R	R	36
IMT-2254-02	Berlin-Brandenburg	ST254-MRSA-IV	C	neg.	S	I	S	R	R	R	R	R	36
IMT-1079-04	Berlin-Brandenburg	n.t.	C	neg.	S	R	S	R	S	S	R	R	36
IMT-1374-04	Berlin-Brandenburg	n.t.	C	neg.	S	I	S	R	R	R	R	R	36

Dox: Doxycyclin Ery: Erythromycin Gm: Gentamycin Enr: Enrofloxacin S: Sulfonamid Sxt: Sulfa-Trimethoprim Tet: Tetracyclin  
n.t.: nicht getestet PVL-Gene: Nachweis des Panton-Vanentine-Leukoizidin Faktors



## 5.2.2 MRSA-Isolate von Kleintieren aus Hannover, Gießen, München

Neben den drei von Pferden stammenden MRSA-positiven *S. aureus*-Stämmen aus Hessen, die aus Gründen der Übersichtlichkeit unter Punkt 5.2.1 ausführlich behandelt werden, sind in den zur Verfügung gestellten klinischen *S. aureus*-Isolaten von Kleintier-Isolaten, die uns aus anderen Hochschulen zugesendet wurden, noch sechs weitere MRSA aufgetreten.

Eine zusammenfassende Übersicht mit Angaben über Herkunft, Isolationsort und genetische Eigenschaften bietet Tabelle 17. Aufgrund des Fehlens von genaueren Informationen kann zum Isolationszeitpunkt nur das Kalenderjahr angegeben werden. Weitere Daten zu den einzelnen Fällen sowie Angaben zu möglichen Ursachen für die Infektion durch MRSA liegen leider nicht vor, so dass lediglich die Feststellung einer MRSA-Beteiligung an den genannten Krankheitsfällen zu treffen ist.

**Tabelle 17: Übersicht der MRSA-Stämme von Kleintieren aus Hannover, München und Gießen**

Jahr	Stamm-Bezeichnung	Tierart	Lokalisation	Herkunft	PFGE-Typ	Allele	ST	SCC mec
2003	IMT-1426-03	Hund	Arthritis	Hannover	F	n.t	n.t.	IV
2003	IMT-1645-03	Hund	Wunde	München	D	2-3-1-1-4-4-3	239	IV
2003	IMT-1652-03	Hund	Dermatitis	München	F	3-32-1-1-4-4-3	254	IV
2003	IMT-1659-03	Hund	Blut	München	I	3-32-1-1-4-4-3	254	IV
2003	IMT-2575-03	Katze	Rhinitis	Gießen	H	1-4-1-4-12-25-10	225	IV
2004	IMT-1644-04	Hund	Haut	Gießen	H	1-4-1-4-12-25-10	225	II

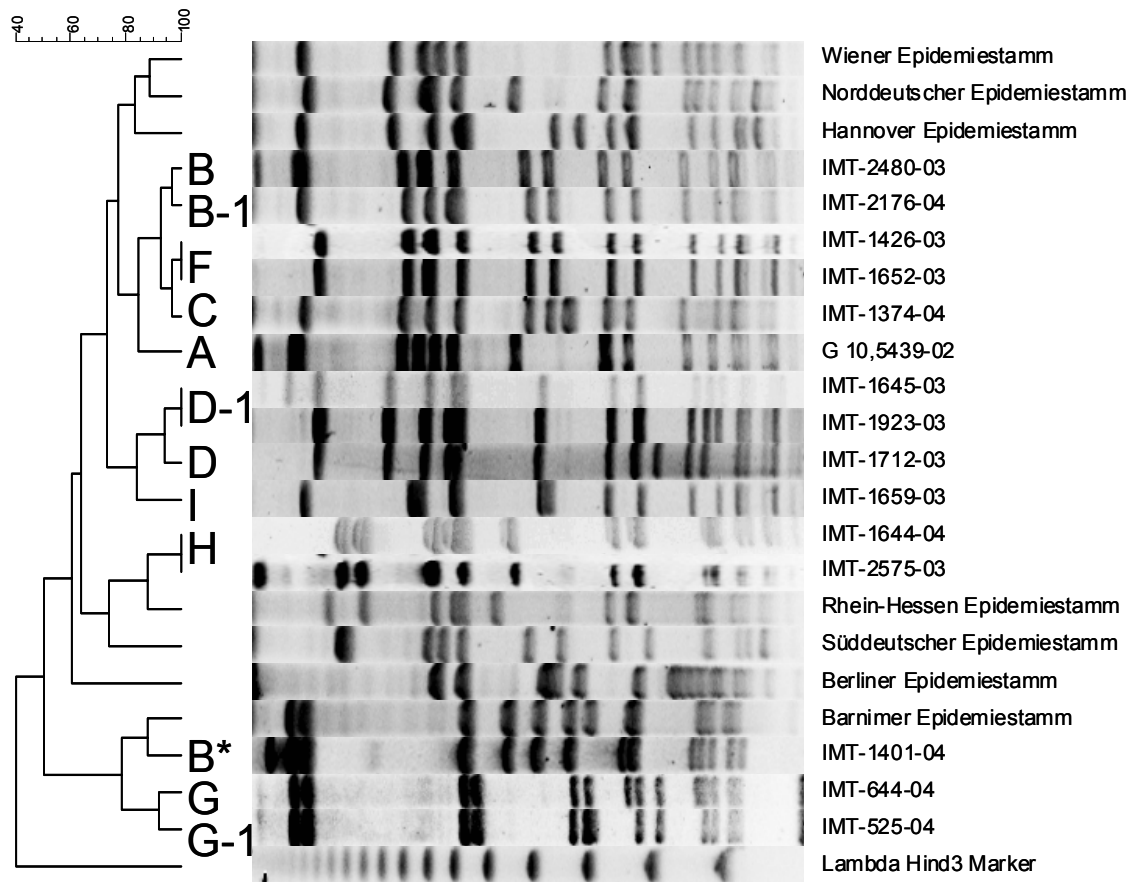
ST: Sequenztyp, SCCmec: Staphylokokken chromosomale Genkassette *mec*, PFGE-Typ: Pulsfeld-Gelelektrophorese-Typ

## PFGE-Resultate der MRSA-Stämme von Kleintieren aus Hannover, Gießen, München

Durch PFGE-Analyse der für diese Arbeit zur Verfügung gestellten klinischen MRSA- Isolate von Kleintieren aus verschiedenen Bundesländern sind drei verschiedene Pulsfeldmuster, "F", "D" und "H" (Tabelle 17 und Abbildung 12) bestimmt worden. PFGE-Typ "D" war ebenfalls in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere in Berlin aufgetreten, sowohl bei nasal mit MRSA kolonisierten Menschen als auch bei klinisch erkrankten Tieren (siehe 5.2.3).

Bemerkenswert ist ferner die Tatsache, dass der PFGE-Typ "F" sowohl in München als auch in Hannover aufgetreten ist.

**Abbildung 12: PFGE-Muster von Kleintier-Isolaten aus Hannover, Gießen, München im Vergleich zu den Isolat-Mustern von Kleintieren aus Berlin, zu PFGE-Typen von Pferden sowie zu humanen Epidemiestämmen**



Dendrogramm aller PFGE-Typen (links) aus dieser Arbeit im Vergleich zu humanen Epidemiestämmen ermittelt durch die Software GelCompar II. Prozentuale Übereinstimmung berechnet durch: Dice Koeffizient (Toleranz 1%, Optimierung 0,5%) unter Anwendung von UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean); nach Sokal und Mitchener (1958)

## MLST-Analyse

Es wurden die ST254 und ST225 festgestellt. Der ST254 trat bei IMT-1652-03 und IMT-1659-03 auf, während ST225 bei IMT-2575-03 und IMT-1644-04 nachweisbar war. Siehe auch Tabelle 17.

## SCCmec-Analyse

Während bei den Stämmen IMT-1645-03, IMT-1426-03, IMT-1652-03, IMT-1659-03 und IMT-2575-03 der Kassettyp *SCCmec* IV nachgewiesen wurden, konnte bei IMT-1644-03 Typ *SCCmec* II mittels PCR nachgewiesen werden.

## Panton-Valentine-Leukozidin-Gene

Keines der untersuchten Isolate zeigte eine positive PCR für die Panton-Valentine Leukozidin-Gene.

### 5.2.3 MRSA-Isolate von Tieren, Menschen und Gegenständen aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin

Die erstmalige Isolation von MRSA bei einem Hund mit einer schweren Wundheilungsstörung (Fall Nr. 5, Tabelle 18) führte zu einer eingehenden Untersuchung des Vorkommens von MRSA bei kleinen Haustieren in dieser Institution. Über einen Zeitraum von 20 Monaten wurden Tupferproben von erkrankten Patienten, die zur mikrobiologischen Untersuchung in das diagnostische Labor des IMT eingeschickt wurden, immer auch im Hinblick auf MRSA untersucht. Die nachfolgende Zeittafel gibt eine schematische Übersicht über die einzelnen Zeitpunkte, in denen Untersuchungen stattgefunden haben. Im nachfolgenden Text wird die Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin mit "Kleintierklinik" abgekürzt.

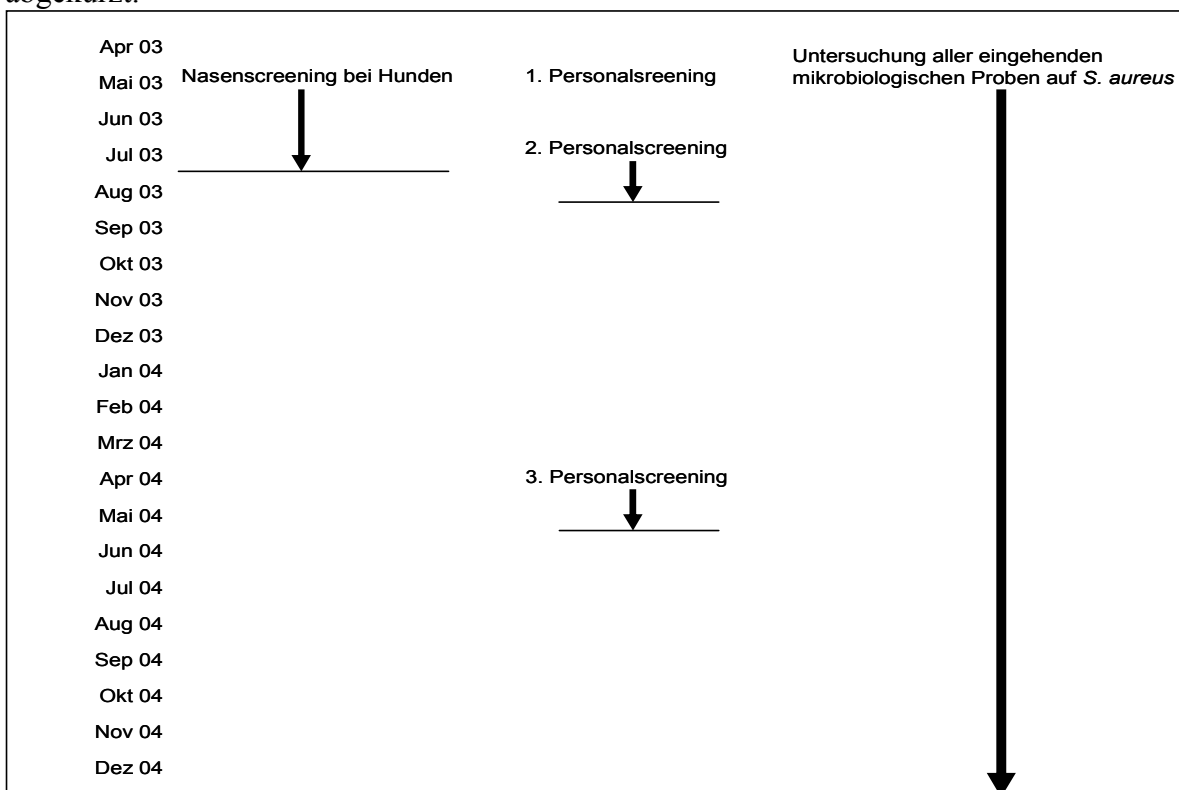


Abbildung 13: Zeitliche Übersicht der in der Kleintierklinik durchgeführten Untersuchungen über 20 Monate; Alle *S. aureus*-Isolate wurden durch PCR auf das Vorhandensein von *mecA* geprüft.

### MRSA-Isolate von Kleintieren der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere

Im genannten Untersuchungszeitraum wurden insgesamt 866 Tupferproben von ambulant oder stationär behandelten Kleintieren (einschließlich der 7 Wundtupfer aus der ersten Untersuchungsperiode bei Hunden im April / Mai 2003) unterschiedlichster Spezies untersucht. *S. aureus* wurde in 6,9% (60/866) Proben gefunden, 26 von diesen waren *mecA*-positiv (Tabelle 17). In 7 Fällen wurde auch in einer Nachuntersuchung MRSA gefunden (Tabelle 18).

Vier weitere aus Wundabstrichen stammende *mecA*-positive *S. aureus*-Isolate aus dem Jahr 2000, welche in der IMT-Stammsammlung aufbewahrt wurden, sind bei den weitergehenden Untersuchungen einbezogen worden. Tabelle 18 zeigt eine Gesamtübersicht aller MRSA-Isolate aus der Kleintierklinik, eine Übersicht über die untersuchten genetischen Merkmale und bietet, soweit verfügbar, epidemiologische Hinweise.

**Tabelle 18: Übersichtsdarstellung zu *Staphylococcus spp.* in klinischen Proben aus der Kleintierklinik (2003-2004)**

Tierart	Anzahl der Isolate insgesamt (%)*:		davon aus Wundinfektionen (%):		davon aus Otitis (%):		davon aus Dermatitis (%):		davon aus anderen Infektionsarten (%):	
	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA
<i>S. aureus</i> Anzahl absolut (entspricht 100%)										
Hund	17 (54,9)	14 (45,1)	14 (45,1)	6 (19,4)	1 (3,2)	4 (12,9)	1 (3,2)	2 (6,4)	1 (3,2)	2 (6,4)
Katze	4 (36,4)	7 (63,6)	3 (27,3)	1 (9,1)	1 (9,1)	2 (18,2)		1 (9,1)		3 (27,3)
Meerschwein	1 (25)	3 (75)		2 (50)			1 (25)			1 (25)
Kaninchen	1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)						
Vogel	1 (14,3)	6 (85,7)	1 (14,3)	5 (71,4)						1 (14,3)
Schildkröte	1 (100)						1 (100)			
Chinchilla	2 (100)			1 (50)		1 (50)				
Eichhörnchen	1 (100)			1 (100)						
Fledermaus	1 (100)		1 (100)							
<b>Summe:</b>	<b>26 (43,3)</b>	<b>34 (56,7)</b>	<b>20 (33,3)</b>	<b>17 (28,3)</b>	<b>2 (3,3)</b>	<b>7 (11,7)</b>	<b>3 (5)</b>	<b>3 (5)</b>	<b>1 (1,7)</b>	<b>7 (11,6)</b>

<sup>1</sup>Cystitis <sup>2</sup>Sinusitis, Pharyngitis; <sup>3</sup>Rhinitis, Cystitis, Sinusitis; <sup>4</sup>mit Osteomyelitis; <sup>5</sup>Stomatitis; <sup>6</sup>Augenerkrankung  
 Zusammensetzung der 60 *S. aureus* Isolate aus dem 20-monatigem Untersuchungszeitraum: Verteilung Methicillin-sensibler *S. aureus* (MSSA) zu  
 Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA), \*Anzahl der Isolate von an *S. aureus*-Infektionen erkrankten Tiere insgesamt, anschließend die  
 Aufschlüsselung nach Tierart und Infektionsort.

## **Ergebnisse des MRSA-Screenings bei Hunden**

Zu Beginn dieser Arbeit wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen stationär behandelte Hunde auf das Vorliegen einer nasalen Kolonisierung durch MRSA untersucht (Abbildung 13). Dabei wurden Proben bei Eintritt in die Kleintierklinik sowie zum Zeitpunkt der Entlassung des Patienten entnommen.

Die einzige Voraussetzung der Hunde für die Teilnahme am Nasenscreening war ein Aufenthalt von mindestens einer Nacht in der Tierklinik. Die Proben wurden einmal täglich genommen. Aufnahmetupfer wurden innerhalb der ersten 36h nach Eintritt des Hundes in die Klinik genommen, Entlassungstupfer am Tag der Entlassung. Dabei wurden insgesamt 257 Nasentupfer und 7 Wundtupferproben von insgesamt 191 Hunden untersucht.

Bei 181 Tieren konnte zu Beginn der Untersuchung ein Nasentupfer entnommen werden, bei 76 Tieren ein Entlassungstupfer. Aus verschiedenen Gründen (Entlassung, Tod, unkooperative Tiere) konnten nur 67 Tiere sowohl zu Beginn wie auch am Ende ihres stationären Aufenthaltes getestet werden. Aus den 181 Aufnahmetupfern wurden 10 *S. aureus* (5,5%) isoliert, drei davon waren *mecA*-positiv (MRSA:1,7%). In den 75 Tupfern des Entlassungstages konnte *S. aureus* in 8 (10,7%) Fällen gefunden werden, 4 (5,3%) davon waren MRSA. Drei der 7 Wundtupfer von Hunden aus diesem Zeitraum zeigten sich ebenfalls positiv bei der Testung auf MRSA (42,9%) (Tabelle 18).

## **Ergebnisse der nasalen Untersuchung von Personal und Tierbesitzern auf MRSA in 2003 und 2004**

Ergänzt wurde die Untersuchung der Tiere durch ein Screening von Nasentupferproben der Angestellten in der Kleintierklinik, initial zu Beginn der Untersuchungen im Mai 2003 n=62 (98%), sowie 12 Wochen später im Juli/August 2003 n=62 (81,5%) und erneut im April / Mai 2004 n=88 (97,7%), nach einer Häufung klinischer MRSA-Fälle bei Kleintieren (siehe Tabelle 19 und Abbildung 15).

Aus verschiedenen Gründen wie z.B. Urlaub oder Personalwechsel gelang es nicht, das gesamte Personal zu jedem Zeitpunkt zu testen (Prozentzahl in Klammern).

Im Rahmen der Personaluntersuchung auf das Vorliegen einer MRSA-Kolonisierung zeigte sich folgendes Ergebnis:

Positiv getestet wurden Tupferproben bei 20 Personen. Jeweils eine Person hatte im ersten und im zweiten Personaluntersuchungszeitraum einen positiven Nasentupfer, im dritten Zeitraum waren 18 Personen nasal kolonisiert.

Keiner der untersuchten 12 Besitzer bzw. Angehörigen MRSA-positiver Tiere hatte ebenfalls einen positiven Nasentupfer (siehe Tabelle 18).

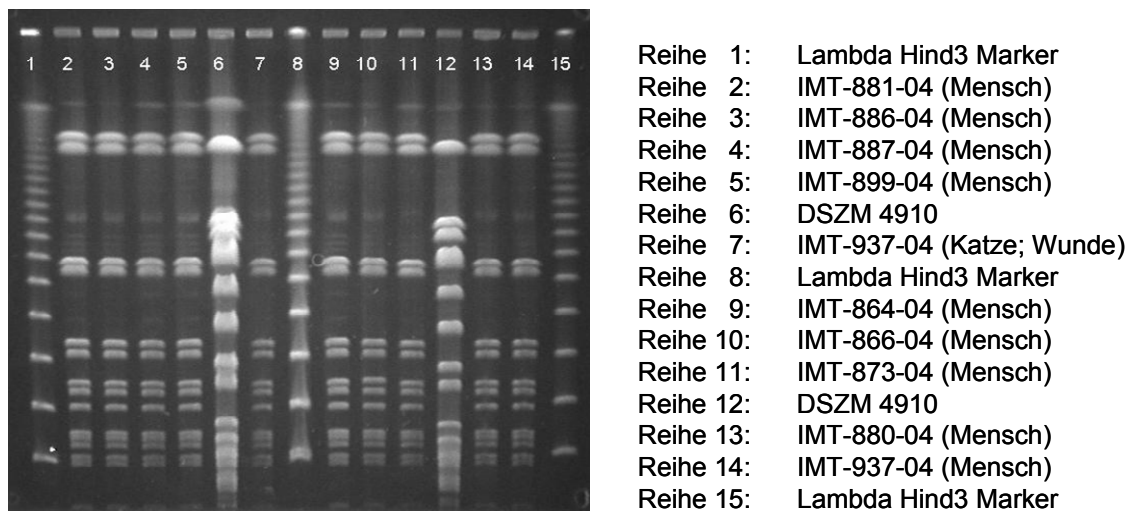
## **Ergebnisse der Untersuchung von Kontaktoberflächen und Gebrauchsgegenständen im Hinblick auf eine MRSA-Kontamination**

Um Verbreitungswege der nosokomialen Infektionen zu finden, wurden zeitgleich mit dem 3. Personalscreening 25 Oberflächen und Gegenstände auf eine Kontamination durch MRSA untersucht. Willkürlich ausgewählt wurden 5 Türgriffe, 2 Scherköpfe, 1 Scherkopfhalter, 1 Behandlungstisch, 1 Fadenmesser, 1 Computertastatur, 1 Laryngoskophandgriff, 1 Schalter am Ultraschallgerät, 1 Griff an Desinfektionsmittelspender, 1 Seifenspender, 1 Ultraschallgefäßflasche, 1 Ultraschallgel, 1 Ultraschallkopf, 1 Ambu-Beutel, 1 Fixierschlingen, 1 Griff von Spritzenvorratskasten, 1 Tubushalter. Auf drei (12%) der untersuchten Gebrauchsgegenstände konnte MRSA nachgewiesen werden, namentlich auf dem Fadenziehmesser, einem Scherkopf und den Fixierschlingen.

## PFGE-Ergebnisse zu MRSA-Isolaten Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere

Die klonale Analyse der aus der Tierklinik stammenden MRSA-Isolate ergab vornehmlich das Vorkommen von zwei Haupt-Klonen, die mit PFGE-Typ "G" und Typ "D" bezeichnet wurden. Beide PFGE-Muster wurden sowohl in Nasenabstrichen des Personals als auch in klinischen Proben der tierischen Patienten nachgewiesen (Tabelle 18 sowie Abbildung 14 und Abbildung 15).

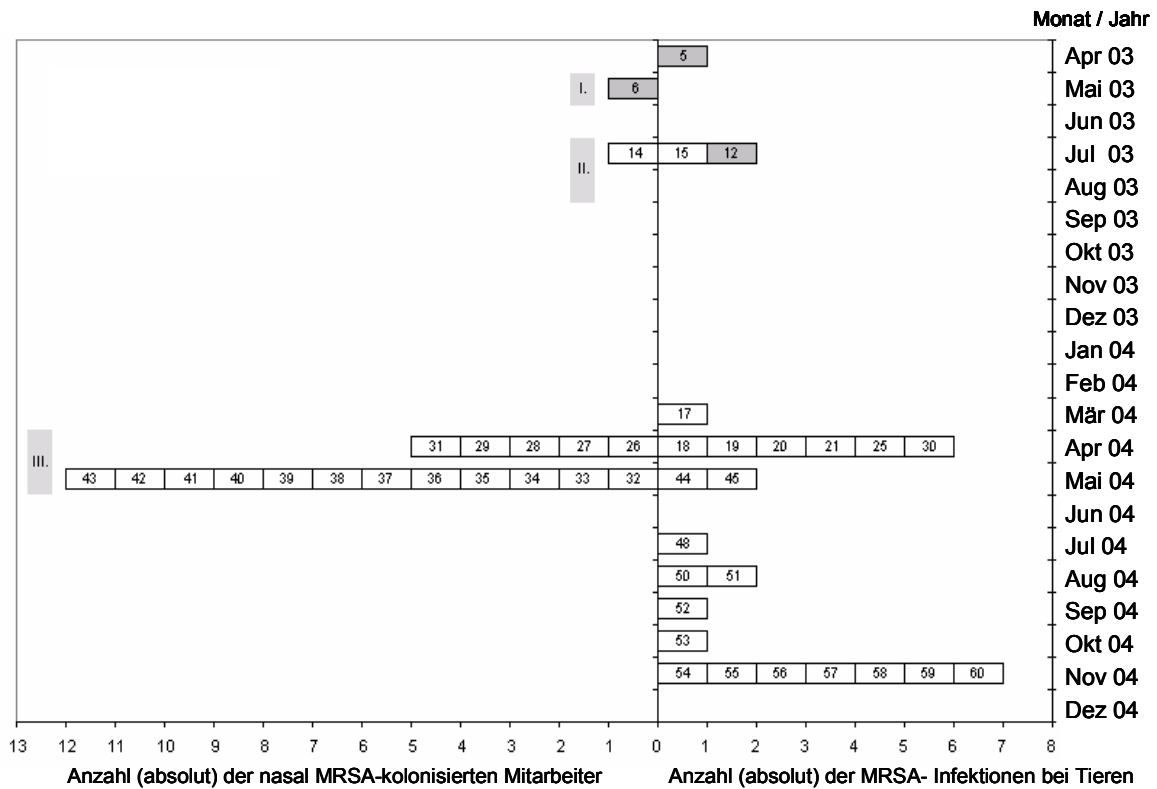
**Abbildung 14: Beispielhaftes Elektropherogramm der genomischen Makrorestriktion mittels Endonuklease *Sma*I: Häufiges Auftreten des PFGE-Typs "G" bei Personalabstrichen und in klinischen Isolaten April/Mai 2004:**



**Beispiele für die häufige Isolation des PFGE-Typs "G" im April und Mai 2004: Reihen 2-5, Reihe 7, Reihe 9-11 und 13-14. Räumlich und zeitlich nahes Auftreten von einem MRSA-Klon, isoliert von Menschen (Nasenvorhof) und Tieren (hier: Katze, Reihe 7)**

Alle positiv getesteten Mitarbeiter stehen täglich im direkten Tierkontakt. PFGE-Typ "G" wurde darüber hinaus auch auf Gebrauchsgegenständen wie einem Scherkopf in der OP-Vorbereitung, einer Fixierschlinge und einem Fadenmesser gefunden. Typ "G-1" wurde bei einem an Pododermatitis purulenta erkrankten Meerschwein gefunden, aufgrund des PFGE-Musters wurde dieser Stamm als in enger Beziehung zu Muster "G" stehend eingestuft. Bei einem Klinikmitarbeiter wurde im Mai 2004 ein neuer PFGE Typ (PFGE-Typ "E") entdeckt, der nachfolgend nicht weiter aufgetreten ist, so dass es sich um ein singuläres Isolierungsereignis bei dieser Person handelte. Der PFGE Typ "D" tritt seit dem Jahr 2000 in der Kleintierklinik auf, PFGE Typ "D-1" differiert nur in zwei Banden von Typ "D". Die Abbildung 14 zeigt das zeitnahe Auftreten von MRSA-kolonisiertem Personal (Reihen 2-5, 9-11, 13 und 14) und der Wundinfektion bei einer Katze (Reihe 7) durch den PFGE Typ "G". PFGE Typ "B\*" (Fall 46), aufgetreten in einem schweren Fall von Otitis bei einer Katze, wurde in Ahnlehnung an den deutschen Epidemiestamm Barnim benannt. 9 Wochen später trat ein MRSA-Isolat mit einem Unterschied von 3 Banden im Makrorestriktionsmuster in einer Wundinfektion bei einem Hund (Fall 49) auf. Auch dieses Isolat wurde als eng zusammenhängend ("B\*-1") mit dem Typenstamm eingestuft. Auf der Abbildung 16 sind alle PFGE-Bandenmuster der Isolate aus der Kleintierklinik im Vergleich zu sieben von Menschen stammenden Epidemiestämmen zu sehen. Deutlich ist erkennbar, dass abgesehen vom sog. „Barnimer-Epidemiestamm“ kein weiterer der zum Vergleich herangezogenen humanen Typenstämmen aus Deutschland im untersuchten Material und Zeitraum auftrat.

**Abbildung 15: Zeitliche Verteilung der PFGE Typen "G" und "D" bei nasal kolonisiertem Personal und erkrankten Tieren der Kleintierklinik**



**Dunkle Kästchen: PFGE-Typ "D", jedes Kästchen repräsentiert einen individuellen Fall**

**Helle Kästchen: PFGE-Typ "G", jedes Kästchen repräsentiert einen individuellen Fall**

**Fall-Nummer in den Kästchen: siehe Tab. 19**

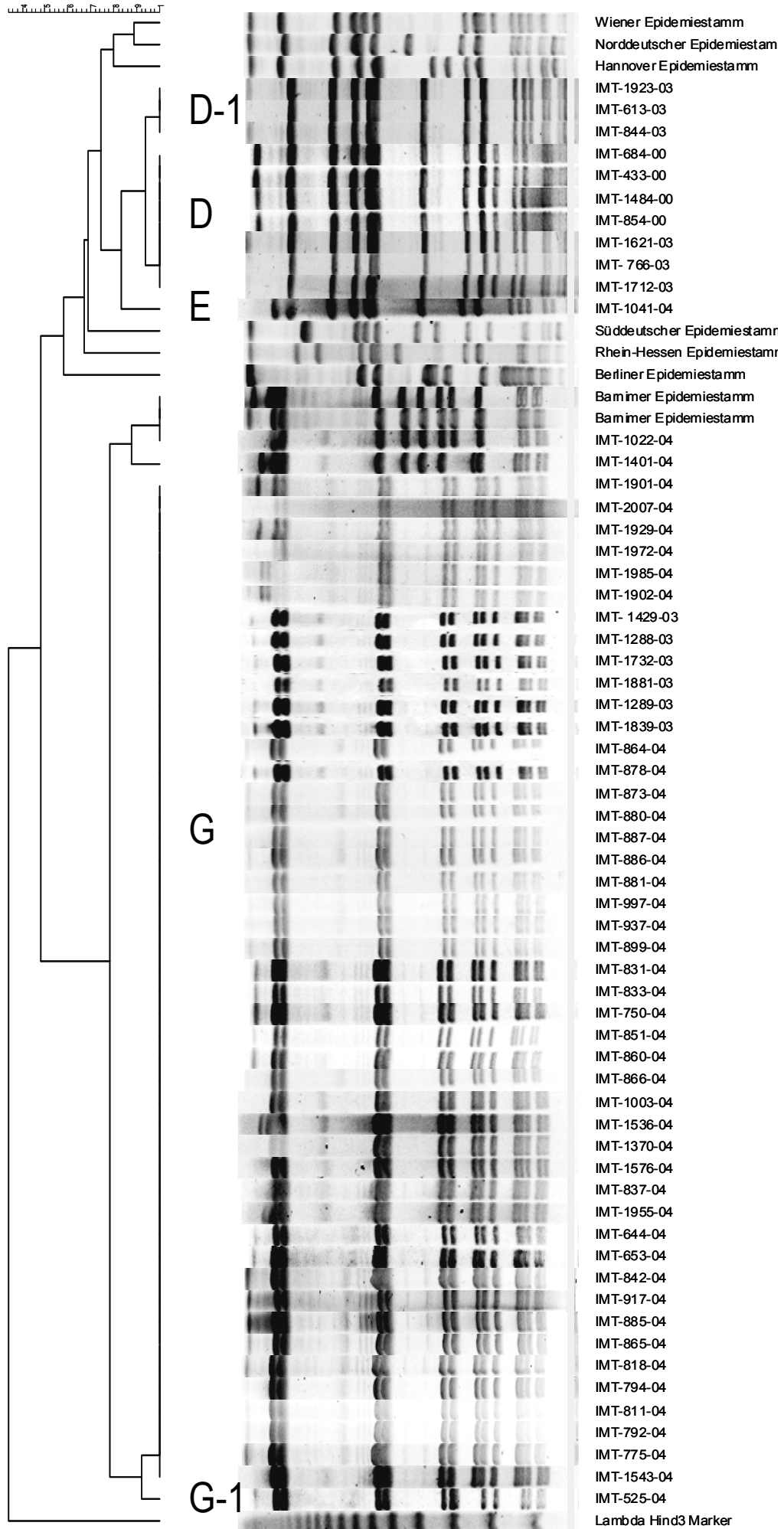
**I. erstes Personalscreening 06.05.2003- 14.05.2003**

**II. zweites Personalscreening 21.07.2003 – 01.08.2003**

**III. drittes Personalscreening 30.04.2004- 24.05.2004**



Abbildung 16: PFGE-Muster und Dendrogramm aller MRSA-Isolate aus der Kleintierklinik im Vergleich zu humanen (deutschen) Epidemiestämmen durch die Software GelCompar II. Prozentuale Übereinstimmung berechnet durch: Dice Koeffizient (Toleranz 1%, Optimierung 0,5%) unter Anwendung von UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean); Sokal und Mitchener (1958).



## MLST-Analyse der MRSA-Isolate aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere

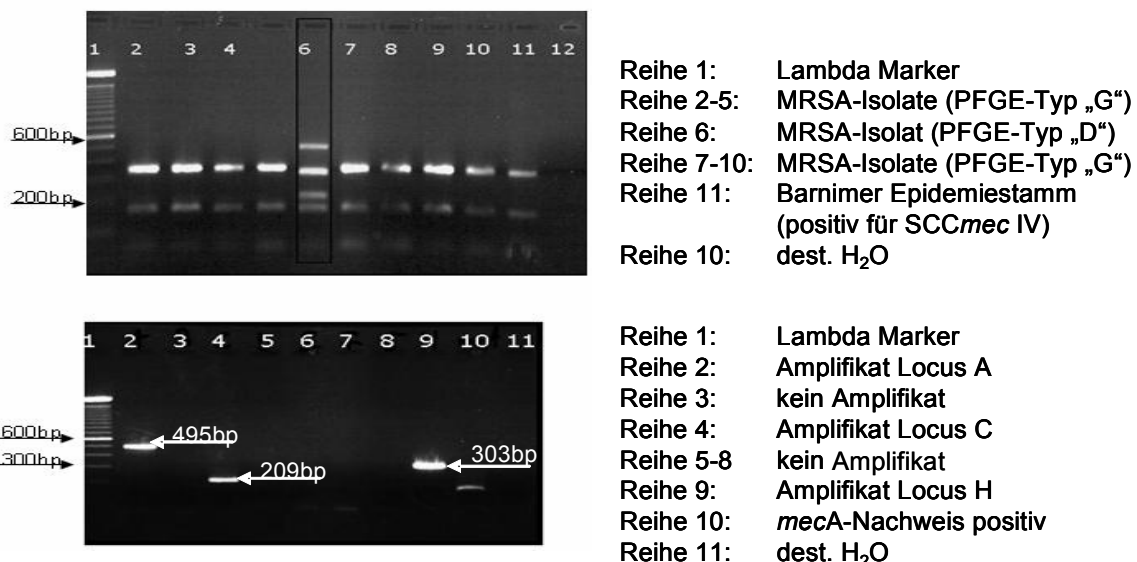
Der Sequenz-Vergleich der nachgewiesenen MRSA-Isolate mit der Internet-Datenbank unter [www.mlst.net](http://www.mlst.net) bestätigte zunächst das Ergebnis der PFGE-Analyse: Zwei genetisch unterschiedliche MRSA-Klone traten in der Tierklinik auf. PFGE-Typ G entspricht laut Sequenzanalyse dem Allelprofil 7-6-1-5-8-8-6, welches dem Sequenztyp (ST) 22 zuzuordnen ist. Der PFGE-Typ D hingegen zeigte das Allelprofil 2-3-1-1-4-4-3, diese Genkombination wird mit ST239 bezeichnet.

Das Isolat mit der Nummer IMT-1022-04 („Barnimer Epidemiestamm“ lt. PFGE-Analyse) ist gemäß Sequenzierung genetisch ein Vertreter des ST22. Der einmalig aufgetretene PFGE-Typ "E" hingegen konnte dem Sequenztyp 239 zugeordnet werden.

## SCCmec-Typisierung der MRSA-Isolate aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere

Die SCCmec-Typisierung mittels Multiplex-PCR nach Oliveira und de Lencastre (2002) erzielte zum Teil nur unbefriedigende Ergebnisse. Während alle isolierten Klone des Sequenztyps 22 (PFGE-Typ „G“, „Barnim-Epidemiestamm“) ein positives PCR-Ergebnis für SCCmec IV zeigten, fiel das PCR-Resultat für die Klon des ST239 (PFGE-Typ „D“) nicht eindeutig aus. Vielmehr wurden positive Signale für die Loci A, C und H sowie ein positives Signal für die PCR-interne *mecA*-Kontrolle registriert. Allein eine eindeutige Zuordnung gemäß der von Oliveira and de Lencastre aufgestellten Kriterien war nicht möglich, da die registrierten Signale Bestandteile der Genkassetten I (Locus A) sowie der Kassetten III bzw. IIIa (Loci G und H) sind. Eine Sequenzanalyse dieser PCR-Fragmente mit anschließendem Abgleich der bislang in Online-Datenbanken hinterlegten Genkassettensequenzen ließ ebenfalls keine genauere Bestimmung zu.

**Abbildung 17: Beispielhafte Elektropherogramme für die SCCmec-Typisierung**



Elektropherogramm oben: SCCmec-Multiplex nach Oliveira et al. mit unklarem Ergebnis für die Reihe 6, da die amplifizierten Abschnitte (A, C, H und *mecA*-Nachweis) nicht klar einem SCCmec-Typ zuzuordnen sind, während Reihen 2-5 und 7-11 typische Amplifikate für SCCmec IV zeigen. Elektropherogramm unten: Wiederholung von oben als Monoplex-PCR mit gleichem Ergebnis; Locus A 495bp, Locus C 209 bp und Locus H 303 bp. Keine eindeutige Typisierung der hier vorliegenden Staphylokokken-Genkassette durch dieses Verfahren. Für weitere Informationen siehe Text.

**Tabelle 19: Charakteristische Merkmale und Bemerkungen zu allen MRSA-Isolaten aus der Kleintierklinik**

Nr.1	Datum	Stamm <sup>2</sup>	Spezies	Isolationsort	PFGE-Typ	Weitergehende Information : Screening- Periode / weitere Proben	ST <sup>3</sup>	SCC mec <sup>4</sup>	Kommentar
1	15.02.00	433-00	Hund	Wundinfektion	D	Kleintierklinik: Isolat aus dem Jahr 2000	239	?	n.v.
2	17.03.00	684-00	Hund	Wundinfektion	D	Kleintierklinik: Isolat aus dem Jahr 2000	239	?	n.v.
3	10.04.00	854-00	Hund	Wundinfektion	D	Kleintierklinik: Isolat aus dem Jahr 2000	n.t.	?	n.v.
4	27.06.00	1484-00	Hund	Wundinfektion	D	Kleintierklinik: Isolat aus dem Jahr 2000	n.t.	?	n.v.
5 <sup>b</sup>	29.04.03	613-03	Hund	Wundinfektion	D-1	B. (2) und Tupfer von Zweithund 19.05.: neg.	239	?	erster Fall in 2003
6	07.05.03	737-03	Mensch	Nase	D-1	erstes Personalscreening <sup>6</sup>	n.t.	?	Kontakt zu Nr. 5, 7, 8
7 <sup>b</sup>	08.05.03	766-03	Hund	Nase	D	A. 27.04.: n. a.; E.: 08.05.: pos.	n.t.	?	2 Wochen Aufenthalt.
8 <sup>b</sup>	19.05.03	844-03	Hund	Nase	D-1	A. 18.05.: n. a.; E., W.: 19.05.: pos.; B. 24.05.: neg.	n.t.	IV	zweiter Aufenthalt
9 <sup>b</sup>	23.06.03	1288-03	Hund	Nase	G	A. 23.06.: pos.; E. 27.06.: neg.	n.t.	IV	Zwinger-
10 <sup>b</sup>	23.06.03	1289-03	Hund	Nase	G	A. 23.06.: pos.; E. n.v.	n.t.	IV	Nachbarn
11 <sup>b</sup>	27.06.03	1429-03	Hund	Nase	G	A. 18.06.: neg.; E. 27.06.: pos.	n.t.	IV	n.v.
12 <sup>b</sup>	07.07.03	1621-03	Hund	Wundinfektion	D	A. n.v.; E. 15.07, B.(2) 14.07.: neg.; W. 14.07.: pos.	n.t.	IV	n.v.
13 <sup>b</sup>	08.07.03	1732-03	Hund	Nase	G	A. n.v.; E. 08.07. pos.; B.: 14.07.: neg.	22	IV	Diabetiker
14	24.07.03	1839-03	Mensch	Nase	G	zweites Personalscreening <sup>7</sup>	22	IV	Tierarzt
15 <sup>b</sup>	29.07.03	1881-03	Hund	Otitis	G	A. 04.07.: neg.; E.: n.v.; W. 29.07.: pos.; B.: 06.11.: neg.	n.t.	IV	häufige Wundbehan.
16 <sup>b</sup>	31.07.03	1923-03	Hund	Nase	D-1	A. 31.07.: pos.; E. n.v.	n.t.	IV	n.v.
17	23.03.04	525-04	Meerschw.	Dermatitis	G-1	B. (2 Erwachsene, 3 Kinder) 06.06.: neg.	22	IV	Langzeitpatient
18	7.04.04	608-04	Hund	Wundinfektion	G	weiter W. 14.04.: MRSA pos.	n.t.	IV	siehe Abb. 15
19	15.04.04	653-04	Hund	Wundinfektion	G	n.v.	n.t.	IV	siehe Abb. 15
20	27.04.04	750-04	Katze	Wundinfektion	G	n.v.	n.t.	IV	siehe Abb. 15
21	29.04.04	775-04	Hund	Dermatitis	G	n.v.	n.t.	IV	siehe Abb. 15
22	30.04.04	792-04	Objekt	Scherkopf	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	OP- Vorbereitung
23	30.04.04	794-04	Objekt	Fadenmesser	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	Ambulanter Raum
24	30.04.04	811-04	Objekt	Fixierschlinge	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	Operationssaal
25	30.04.04	818-04	Hund	Wundinfektion	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
26	30.04.04	831-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
27	30.04.04	833-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
28	30.04.04	837-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
29	30.04.04	851-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
30	30.04.04	860-04	Hund	Wundinfektion	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
31	30.04.04	864-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
32	03.05.04	865-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
33	03.05.04	866-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15

Nr.1	Datum	Stamm <sup>2</sup>	Spezies	Isolationsort	PFGE-Typ	Weitergehende Information : Screening- Periode / weitere Proben	ST <sup>3</sup>	SCC mec <sup>4</sup>	Kommentar
34	03.05.04	873-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
35	03.05.04	878-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
36	03.05.04	880-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
37	03.05.04	881-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
38	03.05.04	885-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
39	03.05.04	886-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
40	03.05.04	887-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
41	03.05.04	899-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
42	04.05.04	917-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
43	05.05.04	937-04	Mensch	Nase	G	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	n.t.	IV	siehe Abb. 15
44	12.05.04	997-04	Katze	Wundinfektion	G	n.v.	n.t.	IV	n.v.
45	12.05.04	1003-04	Hund	Cystitis	G	n.v.	n.t.	IV	n.v.
46	17.05.04	1022-04	Katze	Otitis	B*	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	22	IV	siehe Abb. 15
47	21.05.04	1041-04	Mensch	Nase	E	drittes Personalscreening <sup>8</sup>	239	?	n.v.
48	15.07.04	1370-04	Kaninchen	Wundinfektion	G	zweiter W. 19.07.: MRSA positiv	n.t.	IV	n.v.
49	22.07.04	1401-04	Hund	Wundinfektion	B*-1	n.v.	22.	IV	n.v.
50	23.08.04	1536-04	Hund	Wundinfektion	G	zweiter W. 08.09.: MRSA positiv	n.t.	IV	n.v.
51	24.08.04	1543-04	Hund	Wundinfektion	G	n.v.	n.t.	IV	n.v.
52	07.09.04	1576-04	Hund	Wundinfektion	G	n.v.	n.t.	IV	n.v.
53	20.10.04	1842-04	Hund	Wundinfektion	G	n.v.	n.t.	IV	n.v.
54	02.11.04	1901-04	Katze	Wundinfektion	G	n.v.	n.t.	IV	n.v.
55	02.11.04	1902-04	Papagei	Osteomyelitis	G	zweiter W.: 25.11: MRSA positiv	n.t.	IV	Langzeitpatient
56	08.11.04	1929-04	Fledermaus	Wundinfektion	G	n.v.	n.t.	IV	n.v.
57	11.11.04	1955-04	Hund	Wundinfektion	G	n.v.	n.t.	IV	n.v.
58	16.11.04	1972-04	Hund	Wundinfektion	G	zweiter W.: 03.12.: MRSA positiv	n.t.	IV	n.v.
59	18.11.04	1985-04	Schlickkröte	Dermatitis	G	n.v.	n.t.	IV	Langzeitpatient
60	22.11.04	2007-04	Hund	Wundinfektion	G	n.v.	n.t.	IV	n.v.

B\*.: Deutscher Epidemiestamm Barnim

B\*-1.: in enger Beziehung zu B\* stehend

w.i.: Wundinfektion

A.: Aufnahmezeitpunkt ≤ 36h (date)

E.: Entlassungszeitpunkt (date)

W.: Wundtupfer (date)

O.: (Besitzer, Anzahl wenn mehr als 1), Nasentupfer (Datum)

n.v.: nicht verfügbar (Probe oder Information)

B\*.: Deutscher Epidemiestamm Barnim

n.t.: nicht getestet

1 Fallnummer

2 IMT-Nr.: Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin

8 drittes Personalscreening 30.04.2004- 24.05.2004

3 ST: Sequenztyp [www.mlst.net](http://www.mlst.net)

4 SCCmec: staphylococcal cassette chromosome mec

5 12 Wochen nasales Screening bei Hunden (27.04-30.07)

6 erstes Personalscreening 06.05.2003- 14.05.2003

7 zweites Personalscreening 21.07.2003 – 01.08.2003

## Panton-Valentine-Leukozidin Gene bei MRSA-Isolaten aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere

Keines der untersuchten Isolate zeigte eine positive PCR für die Panton-Valentine Leukozidin Gene.

## Ergebnisse der MHK-Bestimmung bei MRSA-Isolaten der PFGE-Typen "G" und "D"

Tabelle 20: MHK-Bestimmungen von PFGE-Typ "G" und "D"

Wirkstoff	PFGE-Typ "G"	Kommentar	PFGE-Typ "D"	Kommentar
Ampicillin	64	R	≥ 128	R
Amoxicillin-Clavulansäure	16/8	R	32/16	R
Penicillin	32	R	≥ 64	R
Cefalothin	32	R	≥ 64	R
Cefazolin	≥ 64	R	≥ 64	R
Gentamycin	0,5	S	0,5	S
Enrofloxacin	≥ 32	R	4	R
Tetrazyclin	0,5	S	≥ 128	R
Neomycin	0,5	S	0,5	S
Erythromycin	≥ 64	R	≥ 64	R
Clindamycin	≥ 128	R	≥ 128	R
Sulfamethoxazol	16	S	≥ 2048	R
Oxacillin + 2% NaCl	≥ 32	R	≥ 32	R

**S: sensibel; R: resistent**

Die MHK-Bestimmung zeigt bei Isolaten beider untersuchten PFGE-Typen ("G" und "D") eine eindeutige Resistenz gegen alle  $\beta$ -Lactam-Antiinfektiva. Hingegen unterscheiden sich die Isolate der beiden Typen deutliche im Resistogramm gegenüber Nicht- $\beta$ -Lactamantiinfektiva: Tetrazyclin und Sulfamethoxazol sind bei PFGE Typ G als sensibel einzustufen, während sich PFGE-Typ D als resistent gegen diese Wirkstoffe zeigt (siehe Tabelle 20).

## 5.2.4 Phylogenetische Analyse

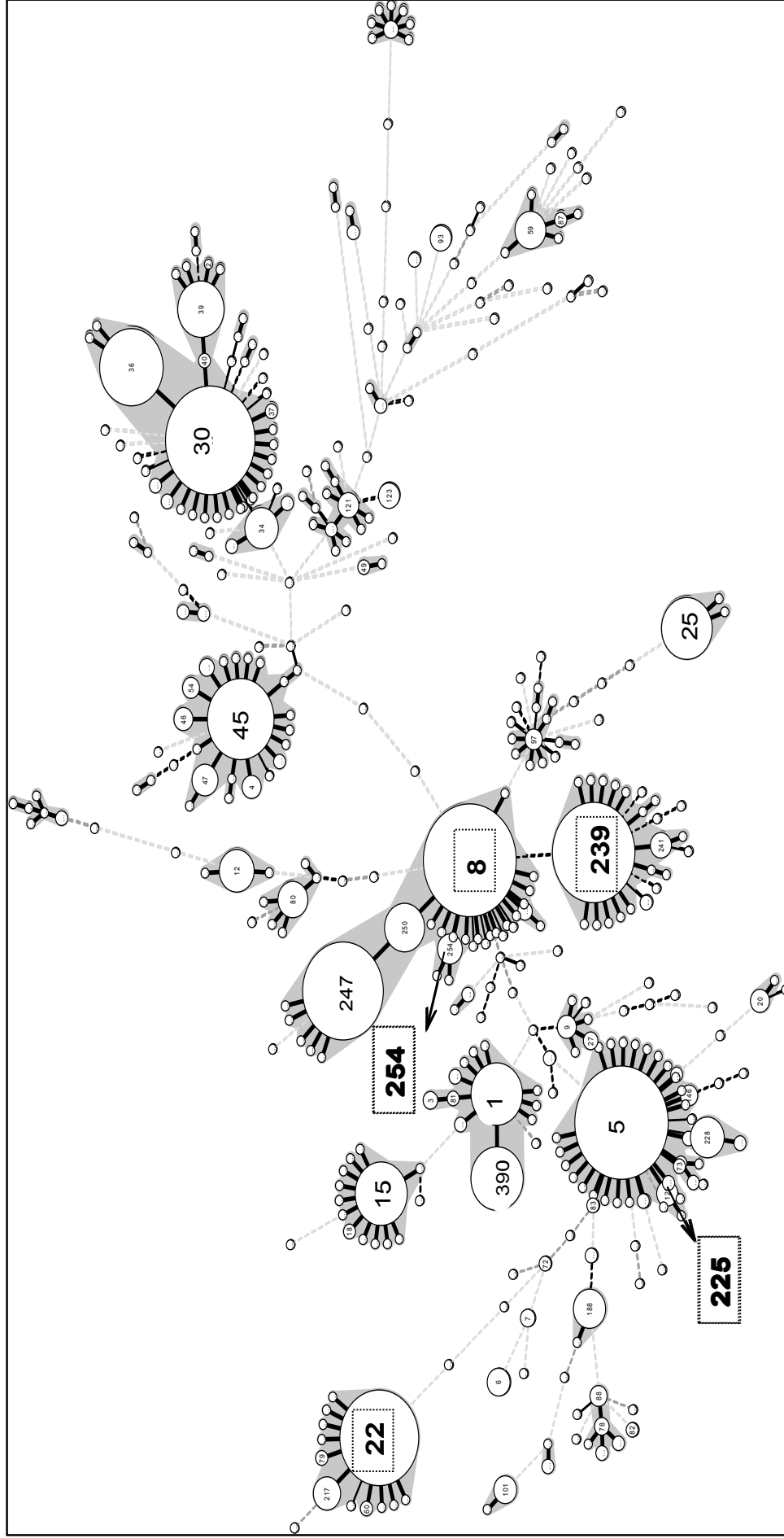
Die ST225, ST239, ST8, ST254 und ST22, die als MRSA-Genotypen von Tieren ermittelt werden konnten, sind unter Zuhilfenahme der Software BioNumerics (Version 4.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) durch nachfolgende Grafik in einem Populationsmodell abgebildet. Der Abgleich mit der MLST-Datenbank ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)) zeigte, dass alle in dieser Arbeit beschriebenen animalen MRSA-Genotypen auch beim Menschen als klinische MRSA bereits in Erscheinung getreten sind, z.T. weltweit und seit Jahrzehnten, in jedem Fall auch in Deutschland.

Die gesamte *S. aureus* Datenbank wurde unter besonderer Berücksichtigung der hier aufgetretenen STen mit der Software BioNumerics analysiert. Die klonalen Komplexe (CC), die STen aus dieser Arbeit enthalten, sind auf der nachfolgenden Abbildung zu sehen. Ein Strich repräsentiert jeweils einen sog. "single-locus variant" (SLV: bedeutet Abweichung in einem Allel (locus)). Klonale Komplexe (CC) sind in dieser Arbeit nach den Vorgaben von Engrigh et al. (119) definiert worden, in der Populationsübersicht sind zusammenhängende CCs grau unterlegt.

Die häufig auftretenden ST239 und ST8 stehen sich genetisch sehr nahe (eine SLV) und beide stehen auch zum ST254 (eine SLV zu ST8) in einem nennenswert engen Verhältnis (alle im CC8) (119), während der ebenfalls häufige ST22 zentraler Genotyp eines anderen klonalen Komplexes, des CC22 ist. Der ST225 (CC5) ist dagegen erst kürzlich erstmals in Deutschland beschrieben worden (114). Dabei ist ebenfalls, wie bei Isolat IMT-1644-00 aus dieser Arbeit, der *SCCmec* II in diesem Zusammenhang aufgetreten. Der ST225 ist ein Abkömmling von zentralen ST5, der wiederum als Vorgänger für insgesamt 45 SLV's und 12 DLV's (DLV: double locus variant) angesehen wird.

Abbildung 18 ermöglicht also die visuelle Einordnung der in dieser Arbeit aufgetretenen STen in einen Populationszusammenhang durch die Darstellung in einem Minimum Spanning Tree. In dieser Übersicht sind alle animalen STen dieser Arbeit markiert, aus Gründen der Lesbarkeit (limitierend: absolute Größe des Trees) wurden einige wenige STen, die sich weit außerhalb der eigentlichen "Populationszentren" befinden, nicht in die vorliegende Abbildung einbezogen. Der hier gezeigte Minimum-Spanning-Tree erhebt demzufolge keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern will vielmehr die Übereinstimmung animaler STen mit bekannten humanen Isolaten grafisch verdeutlichen.

Abbildung 18: Populationsmodell von *S. aureus* im Minimum Spanning Tree



Sequenztypen (ST) in den Kreisen; Klonale Komplexe (CC) sind grau unterlegt; ST22, ST8, ST254, ST225 und ST239, die auch in dieser Arbeit bei Isolaten von Tieren festgestellt wurden, sind fett gedruckt und mit einem gestrichelten Viereck gekennzeichnet. (Abgebildet wird ein zentraler Ausschnitt der Gesamtpopulation, aus Darstellungsgründen kann nicht die gesamte *S. aureus*-Population gezeigt werden; Weit entfernte ST sind z.T. nicht wiedergegeben).