

6 Diskussion

Evaluierung verschiedener Nachweistechniken für MRSA in der veterinärmedizinischen mikrobiologischen Diagnostik

In dieser Arbeit wurden ergebnisorientiert alternative Möglichkeiten für die schnelle und spezifische Diagnostik von MRSA aus veterinärmedizinischen Einsendungen geprüft. Das untersuchte Material stammte aus klinischen Proben diverser Tierarten, aus Nasentupferproben von Hunden und Menschen, von Gebrauchsgegenständen sowie Oberflächen in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere.

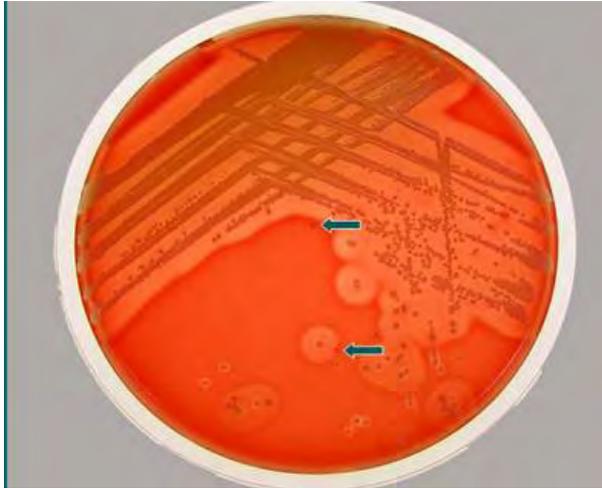
Der tägliche Umgang mit Staphylokokken im diagnostischen Labor hat gezeigt, dass auch praktische Gesichtspunkte für eine zielgerichtete und fundierte Diagnostik von MRSA / MSSA von Bedeutung sind. Da sich das Hämolyseverhalten von *S. aureus* auf Hammelblut-Nähragar äußerst variabel darstellen kann, ist dieses kein verlässliches Merkmal für koagulasepositive Kokken, insbesondere nicht für *S. aureus* (26). Nach einer Bebrütungsdauer von 18h lässt sich häufig keine oder nur eine unscheinbare Hämolyse feststellen, die jedoch nach einer Lagerung von wenigen Stunden im Kühlschrank (86) zu einer ausgeprägten β -Hämolyse werden kann. Dieses Verhalten, welches auch unter dem Begriff hot-cold-lysis-Phänomen bekannt (86) ist, beruht auf einem unterschiedlichen Hämolyseverhalten der α - und β -Toxine in *S. aureus* auf schafbluthaltigen Nährböden. Das bei *S. aureus* von Tieren häufig auftretende β -Toxin hämolysiert Erythrozyten bei 37°C unvollständig, bei unter 10°C jedoch vollständig. Auch ist die Isolierung von Staphylokokken (insbesondere von MRSA) aus stark kontaminierten Proben, wie sie bei Tieren häufiger auftreten, nicht einfach und erfordert ein hohes Maß an Erfahrung, da ein massiver „gramnegativer Overgrowth“ das Staphylokokkenwachstum negativ beeinflusst und außerdem die Aufmerksamkeit des Untersuchers auf die im Vordergrund sichtbaren Keime (meist schnell wachsende gramnegative Flora und Sporenbildner) gelenkt wird, die unter Umständen die tatsächliche Problematik einer MRSA-Infektion zu verschleiern drohen. Das gleiche gilt für Mischpopulationen verschiedener *Staphylococcus spp.*, beispielsweise kann ein massiv überwiegendes *S. intermedius*-Wachstum auf einem Hammelblutagar nach Direktausstrich und 18h Bebrütung bei 37°C vereinzelt auftretende MRSA-Kolonien aus dem Focus des Untersuchers geraten lassen (siehe Abbildung 19: Mischflora *S. intermedius*, vereinzelt MRSA Kolonien). Ein weiteres praktisches Problem bei der Bearbeitung animaler Nasentupfer ist die oft hohe Kontaminationsrate der Proben durch den meist hohen Gehalt an unspezifischen Keimen, die zum einen durch staubige Luft (Tierstall) oder durch artspezifisches Verhalten (häufiger Nasenkontakt mit Artgenossen, eigener Flora oder Oberflächen) die eigentliche Nasenflora zu überlagern drohen.

Der Mechanismus der β -Lactamresistenz von Staphylokokken ist komplex und beruht auf erworbenen sowie natürlichen genetischen Informationen. Vorrangig resultiert diese Resistenz aus der Expression eines zusätzlichen Penicillin-bindenden Proteins (PBP2a), dessen genetische Information durch das Gen *mecA* kodiert wird. PBP2a hat eine niedrige Bindungsaffinität zu praktisch allen β -Lactamantibiotika, die bislang therapeutisch genutzt werden (126).

Der exakte Nachweis dieser Resistenz ist anspruchsvoll, da die phänotypische Merkmalsausprägung sehr stark von dem Grad der PBP2a-Expression abhängt. Aus diesem Grund können verschiedene Resistenz-Level (niedrig, hoch) in der Staphylokokken-Population beobachtet werden. Die Bedeutung der weiteren regulatorischen Gene für den Grad der Resistenzausbildung ist noch nicht vollständig bekannt (109).

Auch in der humanmedizinischen MRSA-Diagnostik zeigt sich, dass eine sichere Speziesdiagnose zwingende Voraussetzung für eine korrekte MRSA-Diagnose ist, insbesondere unter Berücksichtigung der Differentialdiagnose *S. intermedius* (127).

Abbildung 19: Mischflora *S. intermedius*, vereinzelt MRSA Kolonien



Beispiel für Mischkultur aus *S. aureus* (MRSA) / *S. intermedius*: Die wenigen nicht-hämolisierenden Kolonien (dunkle Pfeile) auf der Agarplatte können aus dem Focus des Betrachters geraten, zumal sie nur in geringer Anzahl vorhanden sind. Die MRSA-Infektion bleibt dann unerkannt.

Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose ist die Standard-PCR für einen gleichzeitigen Nachweis der Spezies (*nuc*) und des *mecA*-Gens das beste diagnostische Mittel, auch im veterinärmedizinischen Bereich. Sie ist den auf Resistenzverhalten basierenden Methoden nach wie vor überlegen, wie dies auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die gute Vereinzelnung von Kolonien der zu testenden Stämme ist hier von immenser Bedeutung, denn häufig sind *Staphylococcus aureus* mit anderen Staphylokokken-Spezies vergesellschaftet, so dass eine (kaum sichtbare) Mischkultur von *S. aureus* und *mecA*-positiven KNS trotz Einsatz dieser sicheren genbasierten Methode zu einem Fehlergebnis führen kann. Eine gut angefertigte Subkultur mit deutlich abgrenzbaren Einzelkolonien verringert dieses Risiko erheblich (137).

Wie diese Arbeit zeigt, können auch Resistenztestungen mit dem Agardiffusionsverfahren zur MRSA-Diagnostik für animale *S. aureus* herangezogen werden. Bei einer gezielten Auswahl des einzusetzenden Testwirkstoffes (z.B. Cefoxitin) lassen sich akzeptable Ergebnisse erzielen (102).

Nachweismethoden für MRSA in der Veterinärmedizin

MRSA sind eine der bedeutendsten Ursachen für nosokomiale Infektionen weltweit. Aus diesem Grund ist man seit vielen Jahren darum bemüht, schnelle, effiziente und genaue Nachweismethoden für MRSA zu entwickeln. Bislang unübertroffen ist der Nachweis der Resistenzdeterminante *mecA* durch Amplifikation im PCR-Verfahren, der nach wie vor als „Goldstandard“ für die MRSA-Diagnose gilt. Da aber aus verschiedenen Erwägungen (Kosten, Personal, Zeitintensität) nicht immer eine PCR durchgeführt werden kann, sind alternative phänotypische Nachweismethoden in der MRSA-Diagnostik erforderlich.

Der Filterplättchendiffusionstest wird von verschiedenen Autoren als sinnvolle Methode für den Nachweis der Oxacillin-Resistenz erachtet (83; 102). Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die Sensitivität von Oxacillin 1µg mit 91% dem Einsatz von Oxacillin 5µg (86%) scheinbar überlegen ist, wie dies auch schon von Felten et al. (2002) für humanmedizinische Isolate gezeigt werden konnte. Im Hinblick auf die Spezifität der Aussage wird dieses

Ergebnis jedoch stark relativiert: Oxacillin 1µg erzielt hier lediglich 81%, während mit Oxacillin 5µg 96% Spezifität zu erreichen sind. Auch der positive Vorhersagewert (ppv) liegt bei Oxacillin 5µg bei 82%, während Oxacillin 1µg lediglich 51% erzielt.

Insgesamt betrachtet werden jedoch bessere Resultate erzielt, wenn statt Oxacillin ein anderes penicillinasefestes β-Lactam-Antiinfektivum vom Cephmycin-Typ wie Cefoxitin (30µg) für den diagnostischen Einsatz verwendet wird. Hier lässt sich durch Festlegen des Resistenzlimits auf 23mm ≥ R eine Spezifität von 100% für die Erkennung von MRSA erlangen, wobei der ppv dennoch nur bei 84% liegt, dabei der npv jedoch ebenfalls 100% erlangt. Wodurch die gute Korrelation von Oxacillin-Resistenz und deren Nachweis durch Cephmycin bedingt ist, ist bislang unklar (103).

Weiterhin zeigt diese Untersuchung, dass alle phänotypischen Nachweismethoden mit einem potentiellen Fehler behaftet sind. Es gilt zu entscheiden, ob zugunsten einer hohen Sensitivität vereinzelte potentielle "Fehleinschätzungen" von MSSA als MRSA toleriert werden können oder nicht. Auch beim Einsatz des Oxacillin-Screening-Agar kann eine hohe Sensitivität (100%) und gute Spezifität (max. 98%) erzielt werden, wie dies auch schon in ähnlicher Weise für humane MRSA gezeigt werden konnte (83). Aber schon unter Abschnitt 5.1.3 wurde erläutert, dass diese Methode dennoch Schwächen in der methodischen Umsetzung (Sichtbarkeit des Wachstums) hat. Auch führt eine schlecht angefertigte Suspension bei Herstellung der 0,5 McFarland-Verdünnung (*S. aureus* neigt in Lösung zur "Verklumpung") zu "Pseudowachstum" auf den Platten.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Erweiterung der MRSA-PCR nach Merlino et al. (2002) um den Nachweis von *S. intermedius* durch Einbeziehung der entsprechenden Primer (101) steht nun eine PCR zum gleichzeitigen Nachweis von MRSA, MSSA, *mecA*-positiven KNS, MRSI und MSSI zur Verfügung.

MRSA und MRSI bei Kleintieren und Kontaktpersonen in dieser Arbeit

In dieser Studie wurde *S. aureus* in insgesamt 320 Fällen (201 Tiere, 78 Menschen, 3 Gegenstände) isoliert, dabei konnte 89mal die Diagnose MRSA gestellt werden. Bei 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 auf Gegenständen gefunden. Bei den im Rahmen dieser Untersuchung getesteten Angehörigen von MRSA-infizierten Tieren konnte in keinem Fall eine (nasale) Kolonisation durch MRSA nachgewiesen werden.

Ferner wurden 219 *S. intermedius* nachgewiesen. In keinem Fall konnte das *mecA*-Gen in diesen Stämmen detektiert werden. Ebenso wurden 419 *mecA*-negative koagulasenegative Staphylokokken (KNS) sowie 65 *mecA*-positive KNS festgestellt.

Bei Katzen in Brasilien sind erstmals 1998 in einer Untersuchung zur Prävalenz von Staphylokokken-Spezies und deren Resistenzmustern MRSA als möglicher Bestandteil der Hautflora aufgefallen, die 21,4% der *S. aureus* Population repräsentierten (64). In Illinois, USA haben Gortel et al. bereits 1999 vor Schwierigkeiten bei der Behandlung von MRSA-infizierten Hunden gewarnt, nachdem neun Methicillin-resistente *S. aureus* bei Hunden nachgewiesen wurden sowie ein *mecA*-positiver *S. intermedius* (125). Im Jahr 2003 wurde erstmals über eine postoperative Wundinfektion durch MRSA bei Hunden in den Niederlanden (118) und Deutschland (140) berichtet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zu MRSA bei Tieren aus ganz Deutschland zeigen, dass MRSA-kolonisierte sowie infizierte Tiere in diesem Land keinen Seltenheitsstatus besitzen, sondern belegen das vorhandene Risiko einer MRSA-Infektion (-Kolonisation) für nahezu alle Tierarten im hospitalnahen Bereich und darüber hinaus. Die hier ermittelten Daten verdeutlichen den dringenden Forschungsbedarf zur Aufklärung der Prävalenz von MRSA in

Tierpopulationen. Sollten Haus-, Heim- und Hobbytiere in nennenswertem Umfang Träger von MRSA sein, hätte dies unmittelbare Auswirkungen auf die Behandlung sowie das Hygienemanagement insbesondere in Tierkliniken.

Darüber hinaus hätte dies auch direkte Auswirkungen auf die Risikobewertung von Humanpatienten. Tatsächlich ist die konkrete Transmission zwischen Tieren und Menschen im häuslichen Bereich bereits belegt, weshalb Haustiere jeglicher Art in die epidemiologischen Überlegungen zur Übertragung und Verbreitung von MRSA einzubeziehen sind. So zeigt der von Manian (2003) beschriebene Fall einer ständigen Re-Kolonisation und -Infektion eines Mannes, der an einem diabetischen Unterschenkelulkus litt und seiner Frau, wie wichtig es ist, Tiere als potentielle Überträger von MRSA in Betracht zu ziehen. In diesem konkreten Fall war der Haushund der Familie nasal mit MRSA kolonisiert. Dies führte dazu, dass nach mehrfacher Dekolonisationstherapie u.a. mit Glycopeptiden (Vancomycin) schon nach wenigen Tagen eine Neubesiedlung des Patienten und seiner Frau zu beobachten war. Erst als die Ursache für die ständig erneut positiven Abstriche, namentlich der Hund, in die Eradikationsbemühungen einbezogen wurde, gelang es, die Familie samt Hund längerfristig von MRSA zu sanieren (42).

Dieser Fall birgt noch eine zweite wichtige Komponente: Die Gefahr der Glycopeptid-Resistenzbildung. Bei einem nasal kolonisierten Tier, das mit einer gewissen anzunehmenden Häufigkeit MRSA mit seinem unter Glycopeptid-Antibiose stehenden Besitzer austauscht, steigt die Gefahr einer Resistenzbildung unter Umständen deutlich an.

Außerdem stellt sich die Frage nach dem therapeutischen Einsatz von Glykopeptid-Antibiotika insbesondere bei Kleintieren im Falle einer MRSA-Infektion. Neben den praktischen Problemen bei der Verwendung von Antiinfektiva dieser Wirkstoffklasse wie Ototoxizität, der ausschließlich parenteralen Gabe, Schmerz sowie der Reizung von Venenwänden sollte man die Verabreichung dieser Reserveantibiotika der Humanmediziner grundsätzlich vermeiden, da letztlich jeder Einsatz die Resistenzbildung negativ beeinflussen kann (siehe auch unten: Einsatz von Antiinfektiva).

Auch die Infektkette Mensch zu Tier darf nicht hierbei nicht außer Acht gelassen werden. Oughton et al. (2002) kommen nach der Untersuchung von vier Fällen von MRSA-Infektionen bei Hunden zu dem Schluss, dass auch Menschen, die MRSA-kolonisiert sind oder an einer Infektion leiden, zum Schutz von operierten oder anderweitig schwer erkrankten Tieren effektive Barriere-Vorkehrungen treffen sollten (18).

Die hier gezeigten Ergebnisse ermöglichen unseres Wissens erstmals einen tieferen Einblick in die MRSA-Problematik bei Kleintieren in Deutschland. Zum einen konnte bewiesen werden, dass MRSA im Kleintierbereich zu einem Ausbruchsgeschehen führen kann, welches in diesem Fall durch ein zeitnahes Auftreten von klinischen Infektionen, nachweislich kolonisierten Personen mit engem Tierkontakt und kontaminierten Gegenständen mit identischen Genotypen (PFGE Typen "G" und "D") gekennzeichnet ist (1). Eine wichtige Schlussfolgerung ist, dass mit einer Risikobewertung für nasal kolonisierte Haustiere oder gar Tiere mit infizierten Wunden, die den Besitzern für die häusliche Pflege übergeben werden, in ähnlicher Weise verfahren werden sollte wie im humanmedizinischen Bereich. In Großbritannien ist man aufgrund einer jahrelangen öffentlichen Diskussion über animale MRSA, die unter anderem in Schlagzeilen wie "Hospital superbug - MRSA spreads to animals" von Jo Revill, health Editor in "The Guardian", Sunday December 14, 2003, Ausdruck fand, weiter fortgeschritten in der Betrachtungsweise von MRSA bei Tieren. Heute steht interessierten Patientenbesitzern und Tierärzten eine öffentlich zugängliche Informationswebsite der British Veterinary Association zu diesem Thema zur Verfügung:

www.bsava.com/resources/mrsa/mrsaguidelines/mrsaguidelines.htm.

Nach den hier vorliegenden Daten müssen auch wir Tierärzte in Deutschland uns dieser Problematik zukünftig noch stärker offensiv stellen. Die Prävalenz von MRSA bei Tieren in Deutschland lässt sich aus dieser Arbeit nicht ableiten, da einerseits die epidemiologische

Situation nur an einem Ort (Kleintierklinik) über einen längeren Zeitraum beobachtet wurde, und andererseits eine gezielte Auswahl der Staphylokokken-Isolate durch die beteiligten einsendenden mikrobiologischen Labore und Institute vorgenommen wurde. Selbst in der Humanmedizin sind derzeit keine verlässlichen Zahlen für ein bundesweites Vorkommen von MRSA in der Bevölkerung bekannt, lediglich der prozentuale Anteil Oxacillin-resistenter Isolate an klinisch untersuchten *S. aureus*-Stämmen von derzeit ca. 20% (2004) kann durch eine fortlaufende Multicenter-Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (www.P-E-G.de) für Deutschland angegeben werden (15). Dennoch erlauben die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen MRSA-Fälle einige Feststellungen:

- a) MRSA kommen bei Tieren in Deutschland vor, und zwar sowohl als Infektionserreger sowie (vermutlich meist unerkannt) auch als nasaler (evtl. transienter) Kommensale;
- b) ein identischer MRSA-Genotyp (Klon) kann in Infektionsgeschehen bei mehreren verschiedenen Tierarten nachgewiesen werden;
- c) MRSA können auch in der Veterinärmedizin im Zuge eines nosokomialen Verbreitungsgeschehens auftreten;
- d) alltägliche Gebrauchsgegenstände können durch Unachtsamkeit und mangelhafte Hygiene zur Weiterverbreitung nosokomialer Infektionserreger in veterinärmedizinischen Einrichtungen führen.
- e) Personal veterinärmedizinischer Kliniken und Praxen, v.a. Mitarbeiter mit direktem ständigen Tierkontakt (Tierärzte, Pfleger) können im Verhältnis zur Allgemeinbevölkerung ein erhöhtes Risiko für eine Kolonisation oder gar Infektion durch MRSA haben.

Diese Ergebnisse zeigen einerseits die Brisanz, die mit einem nosokomialen Erreger verbunden ist, wie andererseits auch den weiteren Aufklärungsbedarf durch fundierte epidemiologische Forschung. Während des Untersuchungszeitraums dieser Arbeit von April 2003 bis Dezember 2004 sind keine *mecA*-positiven Isolate in den 221 untersuchten *S. intermedius* aufgetreten. Dennoch ist das Vorkommen von *mecA*-positiven *S. intermedius*-Stämmen bereits beschrieben (57) und nach Abschluss dieser Arbeit auch zweimal im diagnostischen Material des IMT aufgetreten. Welche Bedeutung diese neueste Entwicklung für die Behandlung von Erkrankungen durch *S. intermedius* insbesondere bei Haut- und Ohrerkrankungen haben werden, ist bislang nicht absehbar. Möglich scheint eine Entwicklung ähnlich dem in der Humanmedizin bekannten Phänomen der *mecA*-positiven KNS wie *S. epidermidis*, die u.a. als häufige Erreger katheterassoziierter Septitiden auftreten.

Vorkommen von MRSA bei Pferden

Unsere Untersuchung hat gezeigt, dass mit MRSA-Infektionen auch bei Pferden zu rechnen ist und entsprechende Vorsorge- und Hygienemaßnahmen zu treffen sind. So konnten durch diese Arbeit in einer bayerischen Pferdeklinik identische MRSA-Genotypen bei Pferd IMT-2480-03 (Verletzung; Probe vom 04.07.2003) sowie acht Wochen später bei einem zweiten Tier (IMT2484-03; Bauchwunde nach Laparatomie; Probe vom 01.09.2003) festgestellt werden. Diese Fälle müssen keine unmittelbare Verbindung haben und weitere Informationen z.B. über Hygienemanagement oder andere Fälle von dieser Klinik liegen leider nicht vor, dennoch könnten die Infektionen eine gemeinsame Quelle besitzen. Dies ist nach dem derzeitigen Wissenstand im Hinblick auf die Ergebnisse von Weese et al. (60) eher zu erwarten als auszuschließen. Aber auch ein sporadisches Auftreten ist in diesen beiden Fällen

durchaus möglich. Auch bei zwei weiteren Pferden aus einer Pferdeklinik im Raum Berlin-Brandenburg gelang die Isolierung des gleichen MRSA-Klons im Abstand von einer Woche im Dezember 2002 (IMT-2223-02/ IMT-2254-02), auch hier liegen leider keine weiterführenden Informationen vor.

Über das Auftreten und die Verbreitung von MRSA bei Pferden sind bislang nur wenige Untersuchungen veröffentlicht worden. Yasuda et al. (2002) untersuchten 2001 das Vorkommen von *mecA*-positiven Staphylokokken durch Nasentupferentnahmen bei 100 Zuchtstuten in 25 Gestüten im japanischen Hidaka-Distrikt. Bei 13% dieser Tiere waren polyklonale *mecA*-positive Staphylokokken nachweisbar, wobei es sich in der Mehrzahl der Fälle um *S. sciuri* handelte. Sie schlussfolgerten, dass es wahrscheinlicher ist, dass durch den engen Kontakt zwischen Reitpferden und Menschen Staphylokokken-Spezies übertragen werden, als das das *mecA* Gen auf horizontalen Wegen übertragen wird (113).

Ebenfalls in Japan (Hokkaido) wurden 1997 15 Isolate aus Infektionen mit MRSA (Metritiden und eine Fohlendermatitis) bei Pferden einer genetischen Analyse durch PFGE nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* unterzogen. 14 dieser Isolate hatten das gleiche genotypische Profil, ein Isolat wurde als eng verwandt klassifiziert (117), so dass eine klonale Verbreitung angenommen werden kann.

Auch Hartmann et al. (1997) berichteten über die postoperative Wundinfektion eines Pferdes durch MRSA in Wisconsin, USA. Diese Untersucher äußerten die Befürchtung, dass ein Anstieg dieser Fälle analog zu den Entwicklungen im humanmedizinischen Bereich erfolgen kann (80).

Für die in dieser Untersuchung und auch in den anderen Veröffentlichungen dargestellten Fälle stellte sich die Frage nach der Infektionsursache. Häufig wurde ein nosokomiales Verbreitungsgeschehen wie in der Humanmedizin und im Kleintierbereich als Infektionsgrundlage angenommen (31; 38; 58; 60; 65). Der Fall einer postoperativen Wundheilungsstörung bei einem Pferd in Norwegen zeigte jedoch, dass nicht in jedem Fall die Ursache für eine MRSA-Infektion aufgedeckt werden kann. Das Pferd hatte weder eine Vorgeschichte mit intensivem Einsatz von Antiinfektiva noch konnte in der Umgebung (Stall, Tränke, OP-Räume etc.) MRSA nachgewiesen werden, noch entwickelten andere Tiere der betroffenen Pferdeklinik eine ähnliche Erkrankung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit einer MRSA-Problematik bei Pferden jetzt und in Zukunft zu rechnen ist. Gerade auf diesem Gebiet müssen jedoch durch weitere epidemiologische Untersuchungen mögliche Infektionsursachen genauer eingegrenzt werden, eine Aussage in dieser Richtung ist aufgrund des begrenzten Untersuchungsrahmens dieser Arbeit nicht möglich.

Epidemiologische Erkenntnisse über MRSA in Tieren

In dieser Arbeit wurden die MRSA-Isolate mit Hilfe verschiedener molekularer und phänotypischer Verfahren charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Typisierungen dienen der Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge zwischen den einzelnen Isolaten sowie der Beziehung zu bekannten humanen MRSA- und MSSA-Genotyplinen. Zunächst wurde die Diagnose MRSA bzw. MSSA mittels PCR gestellt. Somit wurde das bislang unübertroffene Nachweisverfahren gewählt, welches zum einen durch eine speziesspezifische Sequenz aus einem Nuklease-Genabschnitt (*nuc*) die Speziesdiagnose bestätigt sowie andererseits durch Nachweis des *mecA*-Gens für die Resistenz die Diagnose MRSA / MSSA verifiziert (83).

In einem zweiten, der Typisierung dienenden Schritt, wurden alle MRSA mit der selten schneidenden Restriktionsendonuklease *SmaI* einem Verdau unterzogen, der im Regelfall ca. 14-16 einzelne Fragmente ergab. Durch Auftrennen der Fragmente in einem elektrischen Feld (PFGE) und anschließender Färbung mit fluoreszierendem Ethidiumbromid wurden die Bandenmuster sichtbar und der Analyse zugänglich.

In der Kleintierklinik konnte eine lokale Verbreitung der PFGE-Typen "G" und "D" beobachtet werden. Beide Typen konnten auch aus Nasentupferproben des Personals isoliert werden. Zeitgleich mit einer erhöhten MRSA-Fallzahl trat 2004 eine hohe Anzahl nasal kolonisierter Mitarbeiter auf. Ebenfalls konnte eine MRSA-Kontamination auf 3 von 25 willkürlich ausgewählten Gegenständen des täglichen Gebrauchs festgestellt werden. In diesem Zusammenhang liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es sich in diesen Fällen um eine nosokomiale Verbreitung von MRSA in dieser Institution gehandelt hat (1). In Einzelfällen konnten potentielle Transmissionswege aufgezeigt werden (Tabelle 18). Ferner zeigt ein Vergleich mit den MRSA-Isolaten von Kleintieren aus anderen Bundesländern, dass die hier aufgetretenen Genotypen möglicherweise nicht bundesweit gehäuft in Erscheinung treten.

Alle unterschiedlichen MRSA-PFGE-Typen sind anschließend mittels MLST untersucht worden, um den Vergleich zu bereits beschriebenen humanen Isolaten zu ermöglichen. So ließen sich die hier gezeigten PFGE-Typen bereits bekannten MLST-Genotyplinien zuordnen. Kürzlich wurden neue Sequenztypen (ST) bei Schweinen beschrieben, die bislang bei Menschen noch nicht aufgetreten sind (75). In dieser Arbeit sind jedoch nur ST nachgewiesen worden, die bereits in vielen Ländern (auch in Deutschland) als Genotypen humaner Isolate in Erscheinung getreten sind.

Die Sequenztypen der Isolate von Hunden, weiteren Kleintieren sowie von Menschen und Gegenständen aus der Kleintierklinik mit den PFGE-Typen "G", "D", "E", "Barnim" und "Barnim-1" ließen sich den bekannten ST22 und ST239 zuordnen. Unter Anwendung des BURST-Algorithmus sind die Sequenzdaten der sieben Haushaltsgene den bislang bekannten Genotyplinien sowie ihrer vermutliche evolutionäre Entwicklung zuzuordnen. ST22 ist der zentrale ST des klonalen Komplexes (CC) 22 (119). Hier wird demnach von der Annahme ausgegangen, dass einige weitere Genotypen (hier MRSA ST318, ST278, ST217, ST280) sich aus diesem Genotyp entwickelt haben, so dass der ST22 wahrscheinlich entwicklungsgeschichtlich älter ist als die anderen Genotypen in diesem Komplex. Das gleiche gilt für den ST239, der einer der zentralen Genotypen im CC8 ist (119) und somit phylogenetisch gesehen ebenfalls zu den ältesten Vertreter dieses Komplexes zählt. Ob dieser Gesichtspunkt im Hinblick auf epidemiologische Überlegungen zu animalen MRSA von Bedeutung ist, ist bislang jedoch nicht zu beantworten, denn die Anzahl der untersuchten Stämme ist schlichtweg zu gering.

Das in Abbildung 18 gezeigte Populationsmodell zeigt diese Beziehungen grafisch.

In einer im Dezember 2005 erschienenen Publikation über MRSA-Isolate aus einer ungenannten hannoveranischen Kleintierklinik mit ca. 20.000 behandelten Kleintieren/Jahr wurde ein MRSA-Isolat als PFGE-Typ "A" definiert, das eine große (visuelle) Übereinstimmung mit dem in der vorliegenden Arbeit analysierten PFGE-Typ "G" aufweist. Auch weitere Merkmale wie der ST-Typ (ST22) sowie (teilweise) die *SCCmec*-Klassifizierung (IV) stimmen überein, so dass unter Vorbehalt angenommen werden kann, dass auch in anderen großen Kleintierkliniken dieser oder ein ähnlicher MRSA-Genotyp etabliert ist (56). Informationen über Untersuchungen von Personal und/oder Gegenständen liegen in diesem Fall nicht vor. Eine weitere Studie aus Großbritannien, veröffentlicht im September 2005, führt den Nachweis einer nosokomialen Verbreitung des epidemischen Klonen EMRSA-15 im Queen Mother Hospital for Animals, Royal Veterinary College, London. Hier wurden auch Gegenstände und das Personal in die Untersuchung einbezogen und diese häufig positiv getestet. EMRSA-15 ist ein potentieller Verursacher nosokomialer Bakteriämien (60%) in UK und im hospitalnahen Bereichen weit verbreitet (65). Die an dieser Stelle genannte Prävalenz von 18% bei kolonisiertem Klinik-Personal korrespondiert mit den 20,5% (18 von 88 Personen), die innerhalb des 3. Personaluntersuchungszeitraumes in dieser Arbeit aufgetreten sind. Auch Baptiste et al. (2005) konnten gleiche MRSA-Klone bei Hunden und veterinärmedizinischem Personal nachweisen (124).

Bei Pferden sind die Ergebnisse anderer Untersuchungen unterschiedlich. So haben Weese et al. (73) identische MRSA-Klone bei Pferden und Pferde-Personal nachgewiesen, während Baptiste et al. (124) dieser Nachweis nicht gelungen ist.

Wie schon im Abschnitt 5.2.1 erläutert wurde, sind die PFGE-Muster von Pferde-Isolaten (PFGE Typen "A"- "C") insgesamt als genetisch eng verwandt einzustufen, obwohl diese Proben alle von unterschiedlichen Tieren aus ganz Deutschland stammen. Dieses Ergebnis wird umso deutlicher unterstrichen, betrachtet man die ST dieser Isolate: ST8 und ST254 sind nicht nur Teil der gleichen Subpopulation im CC8, sondern unterscheiden sich lediglich um eine Base (Stelle 15 im Gen *aroE*). Nach Enright et al. 2002 (119) ist ST8 (CC8) der Vorläufer von ST254.

Es gilt also zu diskutieren, ob Pferde-MRSA vielleicht eher durch den horizontalen Eintrag der Resistenzdeterminate *mecA* in eine "pferdespezifische" *S. aureus*-Subpopulation entstanden sind und ob dieses Ereignis sich vielleicht mehrfach ereignet hat, oder ob auch die Isolate von Pferden humanen Ursprungs sind, die Subtypen des CC8 aber einen unbekanntem Vorteil für die Etablierung bei Pferden aufweisen. Nachweislich können auch Kontaktpersonen mit dem gleichen Genotyp besiedelt sein (60). Ohne weitere Untersuchungen im Hinblick auf die "normale" Verteilung von *S. aureus* bei Pferden bleiben diese Überlegungen rein spekulativ. Diese epidemiologischen Fragen sind als zukünftiges Forschungsgebiet von großem Interesse, da Erkenntnisse hier auch für andere Tierarten und insbesondere für den Menschen von Bedeutung sind.

Eine weitere in dieser Arbeit durchgeführte Typisierungsmethode war die *Spa*-Typisierung, diese bezog sich auf die equinen MRSA-Isolate. Die Ergebnisse bestätigten die enge Beziehung aller Pferde-MRSA aus dieser Untersuchung, da sich die verschiedenen *Spa*-Typen (Typ 9, Typ 36, Typ 64) nahtlos in die Reihe der anderen Untersuchungsergebnisse (MLST, PFGE, Resistogramm, SCC*mec*-Typisierung) einfügen. Bei dieser Methode bilden die Polymorphismen eines Gens die Grundlage der Zuordnung zu einem bestimmten Typus. Daraus kann jedoch nicht gefolgert werden, dass Stämme mit gleichem *Spa*-Typ immer genetische Homogenität aufweisen. So konnten *Spa*-Typ 9 und 36 beide in ST254 nachgewiesen werden, wobei *Spa*-Typ 9 bei zwei Tieren aus einer Klinik gefunden wurde.

Die Ergebnisse der *Spa*-Typisierung zeigen, dass der gleiche ST unterschiedliche *Spa*-Typen repräsentieren kann, so dass zusätzliche Kriterien wie Resistogramm oder PFGE-Analyse für eine genauere Charakterisierung herangezogen werden müssen, wenn aus epidemiologischer Sicht hierfür eine Notwendigkeit besteht. Auch andere Merkmale wie z.B. Toxinbildung können hier als Zusatzkriterium verwendet werden, wenn eine zeitintensive PFGE-Analyse vermieden werden soll (72).

Nicht bei allen MRSA-Isolaten konnte die von Oliveira and de Lencastre (2002) beschriebene SCC*mec*-Multiplex-PCR zielführend eingesetzt werden. Die Genkassette IV ist häufig in dieser Arbeit aufgetreten, sie ist auch das kleinste derzeit bekannte und wahrscheinlich mobilste SCC*mec*-Element (32). Während SCC*mec* II auch in der Humanmedizin häufig mit dem ST239 assoziiert ist, konnten andere Genkassetten-Typen nicht oder nur ungenau bestimmt werden. Bei dem in der Kleintierklinik häufig isolierten PFGE-Typ "G" sind positive Amplifikate für die Loci A, C und H aufgetreten, die nach den Vorgaben von Oliveira und de Lencastre (2002) keine eindeutige Klassifizierung zulassen (99). Neuere Arbeiten zum Thema Genkassetten in *S. aureus* zeigen, dass die sich auf die so genannten "J"-Regionen der Genkassetten beziehende Typisierung nach Oliveira Verfahren unterlegen ist, die sich stärker auf die Charakterisierung des strukturellen Aufbaus der Kassette beziehen (48). Die weitere Benennung animaler SCC*mec*-Typen ist genau wie bei humanen MRSA bislang nur unzureichend verwirklicht, so dass in jüngster Zeit Vorschläge für eine Überarbeitung der Typierungsstrategien bzw. der Nomenklatur veröffentlicht werden (48). Auch wurde hier zu Recht auf die Möglichkeit des gleichzeitigen Vorhandenseins

verschiedener SCC*mec*-Kassetten in einem Genom als mögliche Ursache für Fehlschläge bei der Typisierung hingewiesen.

Obwohl PVL-positive MRSA bei Tieren in jüngster Zeit beobachtet worden sind (37), konnte in dieser Arbeit ein entsprechender Nachweis für keines der untersuchten Isolate erbracht werden. Die gewebstoxischen Panton-Valentine Leukozidin Gene (PVL Locus) werden häufig in Zusammenhang mit community acquired (ca-) MRSA in Verbindung gebracht.

Einsatz von Antiinfektiva

Diese Studie zeigt, dass hoch- und multiresistente Infektionserreger mit beachtlichem pathogenen Potential wie z.B. *S. aureus* in der Veterinärmedizin als Problem auftreten können. Jedoch handelt es sich bei Resistenzbildungen nicht um eine genetische Einbahnstraße, d.h. wenn der Selektionsvorteil nicht mehr genutzt werden kann, weil beispielsweise ein bestimmtes Antiinfektivum nicht länger angewendet wird, verlieren viele Mikroorganismen den unnötigen „Ballast“, der durch zusätzliche Gene hervorgerufen wird (10). Eine Langzeituntersuchung der Universitätsklinik Guelph, Ontario (Kanada) über 15 Jahre zur Entwicklung koagulasepositiver Staphylokokken aus klinischen Infektionen von Hunden sowie die Häufigkeit bestimmter Spezies bei Harnwegsinfektionen zeigte, dass im Laufe der Jahre eine Zu- und Abnahme von Resistenzen bei mikrobiellen Infektionserregern zu beobachten waren, die in chronologischer Analogie zum jeweiligen Einsatz der bevorzugten antimikrobiellen Wirkstoffe im Untersuchungszeitraum standen. Insgesamt kam es jedoch zu einem Anstieg von multiresistenten Bakterien, die aus den Harnwegsinfekten isoliert werden konnten (*Enterococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*) (45). Die in dieser Arbeit untersuchten MRSA-Isolate ließen aufgrund ihres Resistenzmusters gegen Nicht- β -Lactame therapeutische Fenster offen. Der Einsatz von Reserveantibiotika wie Glycopeptiden (Vancomycin) in der Veterinärmedizin ist umstritten und sollte mit äußerster Skepsis betrachtet werden. Weese et al. (2005) empfehlen den Einsatz einer Experten-Kommission, die über die Anwendung im Einzelfall entscheidet (59). Eine Resistenzbildung durch unsachgemäßen Einsatz dieses Wirkstoffes in der Veterinärmedizin könnte auch unabsehbare Folgen für menschliche Patienten haben.

Wenn möglich, sollten MRSA Infektionen topisch behandelt werden, dafür eignen sich antiseptisch wirkenden Lösungen wie z.B. 1%ige Chlorhexidinlösung. Auch Mupirocin sowie Fusidinsäurehaltige Präparate können angewendet werden (Resistogramm beachten!) (59). Nicht immer sind MRSA in der Veterinärmedizin gegen alle antiinfektiven Wirkstoffklassen gleichzeitig resistent, so dass Resistogramme häufig eine therapeutische Option zu bieten vermögen.

Abschließende Bemerkungen

Angesichts der Ergebnisse dieser Arbeit und unter Berücksichtigung der hier diskutierten Veröffentlichungen zu MRSA bei Tieren und Kontaktpersonen (Personal, Besitzer) kann die Frage nach dem epidemiologischen Verbreitungswegen von MRSA nach wie vor nur unzureichend beantwortet werden. Alle in dieser Arbeit untersuchten Fälle legen jedoch die Vermutung nahe, dass mindestens einige MRSA-Genotypen keine eindeutige Wirtsspezifität aufweisen, demnach Artengrenzen leicht überwinden können und entsprechend als Zoonoserreger eingestuft werden müssen. Klinische Infektionen bei Menschen durch diese Isolate sind zu erwarten. Eine Antwort auf die Frage nach der Herkunft von MRSA bei Tieren konnte in dieser Arbeit nur teilweise gegeben werden durch den Nachweis von Genotypen, die auch in der Humanmedizin verbreitet sind. Die Herkunft der Resistenzdeterminante bleibt bislang ungeklärt. Einen Eintrag der mobilen Genkassette in gut adaptierte MSSA-Stämme

aus dem veterinärmedizinischen Bereich ist ebenso möglich wie die Verbreitung von humanen Epidemiestämmen bei Tieren, wie dies u.a. durch Loeffler et al. (65) gezeigt werden konnte. Sicher ist, dass MRSA bei Tieren ein zoonotisches Bedrohungspotential für den Menschen bergen und dass MRSA-kolonisiertes Personal ein Risiko für die Patienten einer Tierklinik darstellt. Bereits jetzt sollten Definitionen für Risikopatienten erarbeitet werden und in dem Aufnahmeprozess von Tieren in eine Tierklinik Berücksichtigung finden.

Zukünftig sollten Tiere aus den genannten Gründen unbedingt in die epidemiologischen Untersuchungen im Gesundheitsbereich einbezogen werden. Weiterhin wäre es sehr sinnvoll, wenn die epidemiologischen Daten aus allen Tierbeständen in einer für alle interessierten Veterinäre und Mediziner zugänglichen Datenbank zur Verfügung gestellt würden. Nur so kann mittelfristig ein sinnvolles Bekämpfungskonzept erarbeitet werden und können Trends in der MRSA-Epidemiologie vernünftig nachvollzogen werden.