

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Molekulare Epidemiologie  
Methicillin-Resistenter Staphylokokken  
der Intermedius-Gruppe**

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

vorgelegt von Claudia Ruscher  
Tierärztin  
aus Berlin

**Berlin 2010**

Journal-Nr.: 3418

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

antibiotics, nosocomial infections, antiinfective agents, susceptibility, drug resistance, Staphylococcus pseudintermedius, pyoderma, dogs, cats, horses, multilocus sequence typing

Tag der Promotion: 09.11.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-860-9

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

FÜR PAPA

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum .....</b>	<b>11</b>
2.1	Nosokomiale Infektionen .....	11
2.1.1	Informationen und Erkenntnisse aus der Humanmedizin .....	12
2.1.1.1	Epidemiologie der Antibiotikaresistenz in klinischen Einrichtungen.....	12
2.1.1.2	Ätiologie und Erregerspektrum.....	13
2.1.2	Nosokomiale Infektionen in der Tiermedizin .....	15
2.1.2.1	Häufig isolierte Erreger und Reservoirs.....	16
2.1.3	Spezielle nosokomiale Infektionen und ihre Bedeutung in der Tiermedizin...	20
2.1.3.1	Infektionen durch intravenöse Katheter .....	20
2.1.3.2	Katheter-assoziierte Harnwegsinfektionen .....	21
2.1.3.3	Postoperative Wundinfektionen .....	22
2.1.3.4	Infektionen des Respirationstraktes .....	25
2.1.3.5	Gastrointestinale Infektionen .....	26
2.2	Staphylokokken .....	27
2.2.1	Taxonomische Einordnung und phänotypische Charakteristika der <i>Staphylococcus intermedius</i> - Gruppe (SIG).....	28
2.2.2	Bedeutung von <i>S. (pseud)intermedius</i> als Krankheitserreger .....	30
2.2.3	Virulenzfaktoren und Quorum sensing von SIG.....	32
2.2.4	Resistenzmechanismen gegenüber $\beta$ -Lactam-Antibiotika .....	35
2.2.4.1	$\beta$ -Lactamase Expression.....	35
2.2.4.2	Methicillin-Resistenz .....	36
2.2.5	Molekulare Typisierungsverfahren für <i>S. pseudintermedius</i> .....	37
2.2.5.1	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	38
2.2.5.2	Multilocus Sequence Typing (MLST) .....	39
2.2.5.3	Tandem Repeat Sequenz Analyse des Staphylococcal Protein A ( <i>spa</i> -Typing).....	40
2.2.5.4	Typisierung des mobilen genetischen Elements Staphylococcal Chromosome <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ) .....	41
<b>3</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>43</b>
3.1	Publikation 1.....	43
3.1.1	Zusammenfassung (Übersetzung der Originalpublikation) .....	43
3.1.2	Publikation .....	43
3.2	Publikation 2.....	52
3.2.1	Zusammenfassung (Übersetzung der Originalpublikation) .....	52
3.2.2	Publikation .....	52
<b>4</b>	<b>Ergänzungen und unveröffentlichte Daten .....</b>	<b>65</b>
4.1	Möglicher nosokomialer Zusammenhang verschiedener MRSP Isolate.....	65
4.1.1	Überblick über Anzahl, Art und Verteilung der einsendenden Einrichtungen .....	65
4.1.2	Art des Probenmaterials der 146 MRSP in Abhängigkeit von der Art der einsendenden Einrichtung .....	66
4.1.3	MRSP aus Tierkliniken .....	67
4.1.4	MRSP aus Tierarztpraxen .....	73
4.2	Resistenztestung gegenüber $\beta$ -Lactam Antiinfektiva.....	74

## INHALT

---

<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>Weitere Publikationen im Rahmen der Promotion.....</b>	<b>119</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>121</b>
<b>12</b>	<b>Selbständigkeitsversicherung .....</b>	<b>123</b>

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

---

µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
ADH	Arginin-Dihydrolase
<i>agr</i>	<i>engl.</i> Accessory gene regulator
AIP	<i>engl.</i> Auto-inducing polypeptide
bp	Basenpaare
ca.	circa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNS	Desoxyribonucleinsäure
IgG	Immunglobulin G
inkl.	inklusive
kbp	Kilo Basenpaare
KoNS	Koagulase-negative <i>Staphylococcus spp.</i>
MHK	Minimale Hemmstoff Konzentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MLST	Multilocus Sequenztypisierung
mmol	Milli Mol
MRS	Methicillin-resistente Staphylokokken
MRSA	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i>
MRSIG	Methicillin-resistente Staphylococcus Spezies der intermedius Gruppe
MRSP	Methicillin-resistente <i>S. pseudintermedius</i>
MSSA	Methicillin-sensible <i>S. aureus</i>
MSSP	Methicillin-sensible <i>S. pseudintermedius</i>
NaCl	Natrium Chlorid
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>engl.</i> chain reaction)
PFGE	Pulsfeld Gelelektrophorese
PVL	Panton Valentine Leukozidin
RKI	Robert Koch Institut
rRNA	ribosomale RNA
SCC <i>mec</i>	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
SIET	<i>Staphylococcus intermedius</i> exfoliative toxine
SIG	<i>Staphylococcus intermedius</i> Gruppe

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

---

<i>spa</i>	Staphylococcal protein A
SNP	<i>engl.</i> Single nucleotide polymorphism
ST	Sequenztyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Diese kumulative Dissertation basiert auf zwei Publikationen, die in wissenschaftlich anerkannten Fachzeitschriften mit Gutachtersystem veröffentlicht wurden. Die Publikationen sind als Textversionen in Kapitel 3 integriert, die Originalpublikationen sind über den Elsevier-Verlag im Internet verfügbar.

### **Publikation 1**

**Ruscher, C., Lübke-Becker, A., Wleklinski, CG., Šoba, A., Wieler, LH., Walther, B.**  
**Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae**

**Prävalenz Methicillin-resistenter *Staphylococcus pseudintermedius*, isoliert aus klinischen Proben von Kleintieren und Equiden**

Publiziert in Veterinary Microbiology, 14.04.2009; Ausgabe 136 (1-2): Seiten 197-201

DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.10.023

Eingereicht: 12. August 2008

Akzeptiert: 24. Oktober 2008

### **Publikation 2**

**Ruscher, C., Lübke-Becker, A., Semmler T., Wleklinski, CG., Paasch, A., Šoba, A., Stamm, I., Kopp, P., Wieler, LH, Walther B.**  
**Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrugresistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe**

**Weitverbreitetes, plötzliches Auftreten einer bestimmten genetischen Linie Methicillin- und multiresistenter *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) in Europa**

Publiziert in Veterinary Microbiology

DOI: doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.008

Eingereicht: 23.10. 2009

Akzeptiert: 14.01.2010

## 1 Einleitung

Das häufig zu beobachtende Phänomen der Resistenz von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen ist so alt wie ihr Einsatz bei Mensch und Tier und bereits kurz nach der Entwicklung des Penicillins vor mehr als 80 Jahren in Erscheinung getreten. Untersuchungen zur Evolution der Antibiotika-Resistenz in Bakterien haben gezeigt, dass eine Vielzahl von Antibiotika-Resistenzgenen bereits lange vor dem medizinischen Einsatz der Wirkstoffe in Bakteriengenomen vorhanden war. Die genetische Varianz von Mikroorganismen sowie die durch den vermehrten Gebrauch von Antiinfektiva hervorgerufene Selektion resistenter Varianten hat dabei im Laufe der letzten Jahre und Jahrzehnte zu einer teilweise alarmierenden Zunahme von resistenten und multiresistenten Bakterien geführt. Sowohl in der Tiermedizin als auch in der Humanmedizin sind in den letzten Jahrzehnten multiresistente Erreger besonders im Zusammenhang mit Hospital-assoziierten, so genannten nosokomialen Infektionen zur großen therapeutischen Herausforderung avanciert. Gerade im chirurgischen und intensivmedizinischen Bereich können auch Bakterien, die normalerweise zur Standortmikrobiota zählen, infolge erworbener Multiresistenz schwer therapierbare Infektionen hervorrufen. In der Humanmedizin sind seit Mitte der 1990iger Jahre Surveillance-Strategien zur systematischen Erfassung nosokomialer Problemkeime sowie zur Analyse und Interpretation relevanter Daten etabliert. Hingegen ist in der tiermedizinischen Praxis das Problembewusstsein für nosokomiale Infektionen und die dadurch notwendigen Maßnahmen vielfach nur partiell vorhanden.

Neben *Acinetobacter baumannii*, ESBL- produzierenden *E. coli* und *Klebsiella spp.*, Ceftazidim- und Carbapenem-resistente Pseudomonaden, treten insbesondere Methicillin-resistente Staphylokokken häufig auch Hospital-assoziiert auf. In veterinärmedizinischen klinischen Einrichtungen hat sich innerhalb weniger Jahre nun auch ein originär tiermedizinischer Erreger zum nosokomialen Problemkeim entwickelt. Methicillin-resistente *S. pseudintermedius* (MRSP) werden seit wenigen Jahren vermehrt isoliert und zeichnen sich in der Mehrzahl durch eine beeindruckende Multiresistenz aus. *S. pseudintermedius* ist eine erst seit 2005 anerkannte eigenständige Spezies die neben *Staphylococcus intermedius* und *Staphylococcus delphini* zur *Staphylococcus intermedius* Gruppe (SIG) zählt und in der Vergangenheit sehr häufig fälschlicherweise als *S. intermedius* identifiziert wurde. Informationen über die Prävalenz und Epidemiologie von MRSP aus klinischen Proben sowie über die Bedeutung von MRSP als nosokomiale Infektionserreger in der Tiermedizin sind bislang kaum oder nur vereinzelt verfügbar.

Ziel dieser kumulativen Arbeit ist daher die Feststellung der Prävalenz von MRSP in klinischem Untersuchungsgut verschiedener Tierarten. Dies beinhaltet die exakte Speziesidentifizierung von *S. pseudintermedius* ebenso wie das Erstellen von Resistenzprofilen und den sicheren Nachweis der Methicillin-Resistenz. Eine sichere und eindeutige routinemäßige Diagnostik von MRSP kann letztlich Aufschluss über die klinische Bedeutsamkeit dieses Erregers geben.

Weiterhin sollen Einblicke in die genetische Verwandtschaft von MRSP gewonnen werden, um die Epidemiologie dieses Erregers besser zu verstehen und seine potentielle nosokomiale Bedeutung zu beleuchten. Mithilfe einer breiten Auswahl von Typisierungsverfahren können möglicherweise Rückschlüsse auf die verwandtschaftlichen Zusammenhänge verschiedener Isolate gezogen und gegebenenfalls Ausbruchsstämme identifiziert werden.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Nosokomiale Infektionen

(*Nosokomeion*: gr. Krankenhaus)

Eine nosokomiale Infektion ist laut § 2 des deutschen Infektionsschutzgesetzes eine Infektion mit lokalen oder systemischen Infektionszeichen als Reaktion auf das Vorhandensein von Erregern oder ihrer Toxine, die im zeitlichen Zusammenhang mit einer stationären oder einer ambulanten medizinischen Maßnahme steht, soweit die Infektion nicht bereits vorher bestand (§2 IfSG, RKI).

An anderer Stelle wird die nosokomiale Infektion etwas unübersichtlicher als eine Infektion definiert, die mehr als 48 Stunden nach Aufnahme in das Krankenhaus auftritt, bzw. weniger als 48 Stunden, wenn der Patient innerhalb der letzten zwei Wochen bereits stationär im Krankenhaus aufgenommen war oder die Infektion aus einem anderen Krankenhaus- oder einem Pflegeheim übertragen wurde [1, 2].

In jedem Fall gilt eine Infektion, die sich zum Zeitpunkt der Aufnahme in die klinische Einrichtung bereits in der Inkubationsphase befindet, nicht als nosokomiale Infektion. Weiterhin wird vorausgesetzt, dass es sich um eine klinisch apperente Infektion, und nicht um eine reine Kolonisation handelt. Bei asymptomatischen Patienten kann von einer nosokomialen Infektion gesprochen werden, wenn pathogene Mikroorganismen aus Körperflüssigkeiten oder Körperhöhlen isoliert werden, die physiologisch als steril gelten, wie z.B. dem Blut oder der Cerebrospinalflüssigkeit [1].

Der ungarische Arzt Dr. Ignaz Semmelweis erkannte schon Mitte des 19. Jahrhunderts die Bedeutung und Wichtigkeit der Krankenhaus- und Händehygiene. Er rettete einer Vielzahl von Müttern auf der Entbindungsstation das Leben, indem er Studenten und behandelnden Ärzten vor jeder Patientenbehandlung und Entbindung die Händedesinfektion mit Chlorkalk anordnete und damit einen entscheidenden Beitrag zur Krankenhaushygiene leistete.

Heute sind nosokomiale Infektionen eines der größten Probleme in klinischen Einrichtungen in der Human- aber inzwischen auch in der Tiermedizin. In Deutschland infizieren sich jedes Jahr zwischen 500.000 und einer Million Menschen im Rahmen von Klinikaufenthalten mit nosokomialen Erregern, besonders auf Intensivstationen liegt das Infektionsrisiko bei 15% und ist damit zwei bis zehnmal größer als auf den übrigen Stationen [3]. Nosokomiale Infektionen ziehen verlängerte Klinikaufenthalte, erhöhte Morbidität und Mortalität der Patienten, verzögerte Wundheilungen mit gehäuftem Auftreten von Nahtdehiszenz und Serombildung nach sich und erhöhen einerseits das Leiden der Patienten und andererseits auch die Behandlungskosten erheblich [4-6]. Besonders im Zusammenhang mit multiresistenten Bakterien, die seit einigen Jahren in Krankenhäusern und Tierkliniken endemisch sind, sind nosokomiale Infektionen bedeutsam, da sie in diesen Fällen die Behandlungsoptionen oft erheblich einschränken und zu schweren Komplikationen führen können [7-10].

Obwohl das Problem der nosokomialen Infektionen in der Humanmedizin seit langer Zeit bekannt ist, sind erst Mitte der 1990iger Jahre erste multizentrische Studien und Surveillance-Programme ins Leben gerufen worden, die teilweise sowohl die Prävalenzen nosokomialer Erreger, als auch ihre jeweiligen Resistenzprofile gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen systematisch erfassen und auswerten. In der Tiermedizin sind bislang nur vereinzelte, stichprobenartige Berichte zum Auftreten nosokomialer Infektionen in klinischen Einrichtungen beschrieben, multizentrische Studien und Surveillance-Daten, die für die Kliniken als Referenzdaten dienen könnten, fehlen bislang, obwohl es auch hier seit einigen Jahren Anzeichen für gehäuftes Auftreten nosokomialer Infektionen und steigende Resistenzraten in Isolaten aus klinischen Einrichtungen gibt [11-13].

## **2.1.1 Informationen und Erkenntnisse aus der Humanmedizin**

### **2.1.1.1 Epidemiologie der Antibiotikaresistenz in klinischen Einrichtungen**

In der Humanmedizin hat sich im Zuge der Problematik mit Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) gezeigt, dass insbesondere die Multiresistenz in opportunistischen Pathogenen, mit denen die Patienten und auch das Klinikpersonal unbemerkt kolonisiert sind, ein Risiko für die Entstehung nosokomialer Infektionen darstellt.

Eine Antibiotika-Resistenz kann auf verschiedensten Mechanismen beruhen, z.B. auf enzymatischen Wirkstoff-Modifikationen, der verstärkten Expression von Efflux -Pumpen, einer veränderten Membrampermeabilität, auf Mutationen am Angriffsort der Wirkstoffe oder auf Umgehung mittels sekundärer Stoffwechselwege. Diese Möglichkeiten liegen den Bakterien entweder intrinsisch vor, oder sie werden von horizontal akquirierten Determinanten kodiert. Im letzteren Fall spricht man von erworbenen bzw. sekundären Resistenzen [14]. Die Exposition der Bakterien gegenüber teils subletalen Konzentrationen von Antibiotika und/ oder Desinfektionsmitteln im medizinischen Bereich ist wohl einer der Hauptfaktoren für die Selektion von resistenten Stämmen. Die kurze Generationszeit der Bakterien ermöglicht es ihnen dabei, sich diesen widrigen Lebensumständen vergleichsweise schnell anzupassen [15].

Dies gilt auch für den Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe zur Bekämpfung von Infektionserregern, wobei die normale Standortmikrobiota stets ebenfalls dem Wirkstoff ausgesetzt ist [16]. Resistenz bzw. Multiresistenz können so auch in harmlosen Kommensalen und opportunistischen Bakterien akkumulieren [17]. Diese Veränderungen der mikrobiellen Standortmikrobiota und die unbemerkte Kolonisation mit multiresistenten opportunistischen Bakterien können in Verbindung mit prädisponierenden Risikofaktoren, wie z.B. Immunschwäche oder chirurgischen Eingriffen zur (Auto-) Infektion und zu unerwarteten therapeutischen Komplikationen führen. Der Einsatz von Antibiotika ist also ein prädisponierender Faktor für die Kolonisation und Infektion mit multiresistenten Erregern [15]. In Krankenhäusern kommen naturgemäß permanent verschiedenste antimikrobielle Wirkstoffe und Desinfektionsmittel zum Einsatz, so dass sich hier besonders häufig resistente und multiresistente Mikroorganismen entwickeln und es verwundert nicht, dass an

nosokomialen Infektionen in der Regel multiresistente Erreger ursächlich beteiligt sind [18, 19].

Verstärkt wird die Resistenzentwicklung durch den empirischen Einsatz von Antibiotika, d.h. den auf Erfahrungswerten beruhenden Einsatz bestimmter Wirkstoffe, die anhand von typischen Krankheitsbildern ausgewählt und nicht durch Erregeridentifizierung und Antibiogramme bestätigt werden. Haben diese Wirkstoffe *in vivo* keine oder nur minimale Aktivität gegenüber dem Infektionserreger, wird die Resistenzentwicklung weiter gefördert und resistente Bakterien können verstärkt an die Umgebung abgegeben werden. Ein kalkulierter bzw. empirischer Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen kann weiterhin zur Resistenzentwicklung und zur Verbreitung resistenter Erreger beitragen. Betroffen vom verstärkten Auftreten multiresistenter Bakterien in Krankenhäusern sind aber nicht nur die Patienten, sondern auch das Klinikpersonal, das häufig unbemerkt mit multiresistenten Erregern besiedelt ist [20, 21]. Sowohl für das Personal, das damit ein erhöhtes Risiko einer Infektion trägt, als auch für die oft immungeschwächten Patienten birgt dies Gefahren.

Ein hoher Einsatz von Antibiotika findet auf Intensivstationen statt und hier befinden sich auch besonders geschwächte und kranke Patienten, die nicht selten mehrere Tage, wenn nicht Wochen auf der Station verbleiben. Sowohl für Resistenzentwicklungen als auch für Infektionen mit resistenten Keimen stellen diese Voraussetzungen besondere Risiken dar und so haben Surveillance-Daten aus der Humanmedizin gezeigt, dass Intensivpatienten unter Antibiose das größte Risiko haben an einer Infektion mit multiresistenten Erregern zu erkranken [22, 23]. In einer humanmedizinischen Intensivstation wurden Resistenzen gegenüber verschiedenen Wirkstoffen in *P. aeruginosa* deutlich häufiger festgestellt als in Isolaten aus den übrigen Stationen des Krankenhauses [24]. Zeichnen sich multiresistente Erreger, wie im Fall von Staphylokokken, zusätzlich durch eine hohe Tenazität gegenüber Umwelteinflüssen wie z.B. Trockenheit aus und sind sie zudem leicht auf andere Patienten, Material, Equipment oder Hände übertragbar, entstehen potente nosokomiale Infektionserreger.

#### **2.1.1.2 Ätiologie und Erregerspektrum**

Die an nosokomialen Infektionen beteiligten Erreger können entweder aus der eigenen Mikrobiota des Patienten selbst stammen (endogene Infektion), durch Übertragung vom Personal oder anderen Patienten zum neuen Bestandteil der Kolonisationsmikrobiota werden und in der Folge zur Infektion führen (sekundär endogene Infektion) oder unmittelbar auf den Patienten übertragen werden (exogene Infektion) [25].

Endogene Infektionen, die auf einer Veränderung oder Ausbreitung der eigenen Mikrobiota beruhen sind an nosokomialen Infektionsgeschehen wesentlich häufiger beteiligt als exogene Erreger [1]. Diese opportunistischen Bakterien leben für gewöhnlich mit dem Wirt in unauffälliger Co-Existenz bzw. führen vor allem infolge von Immunschwäche, durch Läsionen an Haut und Schleimhäuten, durch Zugang zu tieferen Gewebeschichten oder zur Blutbahn zu Infektionen. Der Selektionsdruck, der durch antibiotische Behandlungen auf die Standortmikrobiota ausgeübt wird, kann außerdem ihre spezifische Zusammensetzung

verändern und resistente und multiresistente Varianten fördern bzw. die Standortmikrobiota so dezimieren, dass virulentere Erreger sich ungehindert ausbreiten können. An endogenen nosokomialen Infektionen des Menschen sind z.B. Hautbesiedler wie *Staphylococcus spp.* (Koagulase-negative *Staphylococcus spp.* oder *S. aureus*), Darmbesiedler wie *Enterococcus faecium* oder auch *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.* und *Proteus mirabilis* beteiligt [26, 27]. Sekundär-endogene Infektionen entstehen so z.B. durch die Übertragung Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) von dem unbemerkt besiedelten Krankenhauspersonal auf die Patienten, die infolge einer Kolonisation mit MRSA im späteren Verlauf Infektionen entwickeln können [28, 29].

Exogene Infektionen können z.B. durch kontaminierte Medizinprodukte, Arzneimittel, Hautkontakt, Lebensmittel oder Personalkontakt oder andere Patienten übertragen werden und zu regelrechten Ausbrüchen führen [30]. So sind z.B. Ausbrüche in Kliniken verursacht durch *Clostridium difficile* oder Noroviren in der Humanmedizin oft beschrieben [31, 32].

Die häufigsten nosokomialen Infektionen in der Humanmedizin sind katheterassoziierte Harnwegsinfektionen, Pneumonien (meist assoziiert mit Intubation und künstlicher Beatmung), Septikämien und postoperative Wundinfektionen [33].

Auch die Risikofaktoren, die das Entstehen nosokomialer Infektionen begünstigen, können ähnlich wie die beteiligten Erreger sowohl vom Patienten selbst (intrinsisch), als auch von der ihn umgebenden Umwelt ausgehen (extrinsisch). Besonders in ihrer Kombination bzw. beim Auftreten mehrerer Faktoren, erhöht sich das Risiko nosokomialer Infektionen für den Patienten erheblich [34, 35].

**Tabelle 1:**

**Intrinsische und extrinsische Risikofaktoren nosokomialer Infektionen**

Tabelle nach Safdar et al., 2002 [34] und Girou et al., 1998 [35]

<b>Intrinsische Faktoren:</b>
die Schwere der zugrunde liegenden Erkrankung
Immunkompetenz
Alter (Neugeborene, Kinder, alte Patienten)
Ernährungszustand
chronische Erkrankungen (z.B. Diabetes Mellitus)
<b>Extrinsische Faktoren:</b>
Exposition zu virulenten Mikroorganismen (kontaminierte Oberflächen, kolonisiertes Personal, andere Patienten)
Medizinische und chirurgische Eingriffe/ Manipulationen, Medikation
(längerfristige, empirische) Antibiose
Immunsupprimierende Medikamente (Corticosteroide, Chemotherapeutika zur Therapie von neoplastischen Erkrankungen)
Dauerkatheter (Harnwegskatheter, Intravenöse Katheter)
(lang dauernde) chirurgische Eingriffe und Anästhesie
(orthopädische) Implantate
Endoskopie (z.B. retrograde Endoskopie von Harn und Gastrointestinaltrakt)
Intubation und mechanische Beatmung

**2.1.2 Nosokomiale Infektionen in der Tiermedizin**

Auch in tiermedizinischen klinischen Einrichtungen zeichnet sich seit einigen Jahren ein gehäuftes Auftreten nosokomialer Infektionen ab und auch hier sind häufig multiresistente Erreger involviert [11, 13, 36, 37]. Einige Studien konnten bereits zeigen, dass auch in Tierkliniken der Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe zur Selektion von resistenten Mikroorganismen führt. Prescott et al. zeigten, dass sich Resistenzraten gegenüber Fluorchinolonen bei *S. aureus* und *S. (pseud)intermedius* über einen Zeitraum von acht Jahren in einer tiermedizinischen Universitätsklinik von 0 auf 12% erhöhten und diese Veränderungen zeitgleich mit dem verstärkten Einsatz dieses Wirkstoffes in der Klinik auftraten [38]. Auch für *E. coli* sind veränderte Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen,

Ampicillin und Cephalothin im Zusammenhang mit dem Einsatz dieser Wirkstoffe in Tierkliniken beschrieben [39, 40]. So konnten in einer Tierklinik multiresistente *Acinetobacter baumannii* im Vergleich zu sensiblen Stämmen derselben Spezies über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden [41]. Das Fehlen von Surveillance-Daten in der Tiermedizin hat zur Folge, dass für Tiere keinerlei Aussage über das mögliche Risiko an nosokomialen Infektionen in veterinärmedizinischen Einrichtungen zu erkranken möglich ist. Dennoch ist davon auszugehen, dass hier viele Erkenntnisse aus der Humanmedizin übertragen werden können.

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass sich die Dauer des Aufenthalts von Hunden auf einer veterinärmedizinischen Intensivstation auf das Resistenzprofil von *E. coli* aus rektalen Proben dieser Hunde auswirkt. Ferner war ein längerer Aufenthalt signifikant mit erhöhten Resistenzraten gegenüber Ampicillin assoziiert [42]. Auch bezüglich des Vorkommens resistenter Staphylokokken in Tieren konnte belegt werden, dass speziell die Prävalenz Methicillin-resistenter Staphylokokken bei Pferden in einer Klinik wesentlich höher ist als bei z.B. bei Pferden eines Gestüts [43].

### **2.1.2.1 Häufig isolierte Erreger und Reservoirs**

#### **2.1.2.1.1 Endogene und sekundär endogene Infektionen**

Endogene und sekundär endogene Infektionen entwickeln sich auch bei Tieren aus der eigenen Kolonisationsmikrobiota der Haut, des Nasen-Rachen-Raums, des Genital- und Perinealbereichs sowie des Darms [44]. Häufig isolierte Erreger endogener oder sekundär endogener Infektionen bei Tieren sind z.B. Koagulase-positive *Staphylococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *E. coli* oder *Klebsiella spp.* (siehe Tabelle 2).

In einer Schweizer Tierklinik konnten zwei epidemiologisch verwandte Cluster multiresistenter *A. baumannii* nachgewiesen werden, die zu nosokomialen Wundinfektionen bei verschiedenen Tierarten geführt hatten. Nachdem alle Käfige, Boxen und Ställe von unnötigem Material befreit, gründlichst gereinigt und desinfiziert wurden, konnte die Infektionskette durchbrochen und einer der Ausbruchsstämme vollständig eliminiert werden [41]. Dies unterstreicht die Bedeutung der Umwelt und direkten Umgebung der Tiere als sekundär endogene Infektionsquelle. Auch bei *S. haemolyticus* konnten Isolate aus der postoperativen Wundinfektion einer Katze, sowie aus Käfigen der Station mithilfe molekulargenetischer Typisierung in epidemiologische Verbindung gebracht werden [45]. Bei *S. aureus*, die Bestandteil der Mikrobiota vieler Tierarten sein können, ist dennoch auch asymptomatisch kolonisiertes Klinikpersonal als Infektionsquelle z.B. bei der Übertragung von MRSA zwischen Klinikmitarbeitern einer Pferdeklunik und einzelnen Patienten beschrieben [46]. Selbst wenn diese Übertragung zunächst auch bei den Patienten nur zu einer unbemerkten Kolonisation führen sollte, birgt diese dennoch das Risiko einer Infektion des Patienten [47].

**Tabelle 2**

**Opportunistische Bakterien verschiedener Tierarten, die in klinischen Einrichtungen aus nosokomialen Infektionen isoliert wurden**

<b>Isolierte Spezies</b>	<b>Art der Infektion</b>	<b>Referenz</b>
<i>S. (pseud)intermedius</i>	postoperative oder traumatische Wundinfektionen Peritonitiden, Abszesse, Dermatitiden	Boerlin, 2001[41]  Zubeir, 2007 [48]
<i>S. aureus</i>	postoperative Wundinfektionen, Infektionen durch Harn- und intravenöse Katheter	Walther, 2009 [11] Weese, 2008 [49] Leonard, 2006 [50]
<i>S. haemolyticus</i>	postoperative Wundinfektion	Sidhu, 2007 [45]
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Wundinfektionen, Septitiden, Harnwegsinfektionen, Infektionen durch intravenöse Katheter, systemische Infektionen	Francey, 2000 [36] Boerlin, 2001 [41] Vaanechoutte, 2000 [51]
<i>Klebsiella spp.</i>	postoperative Wundinfektionen, Infektionen durch Harn- und intravenöse Katheter	Smarick, 2004 [52] Marsh-Ng, 2007 [53] Weese, 2008 [49]
<i>E. coli</i>	postoperative Wundinfektionen , Infektionen durch Harn- und intravenöse Katheter, Infektionen des Urogenitaltrakts, Sepsis	Ogeer-Gyles, 2006 [54] Marsh-Ng, 2007 [53]
<i>Proteus spp.</i>	Infektionen durch intravenöse Katheter	Marsh-Ng, 2007 [53]
<i>Enterobacter cloacae</i>	postoperative und traumatische Wundinfektionen, Infektionen durch Harn- und intravenöse Katheter	Weese, 2008 [49] Marsh-Ng, 2007 [53]
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	postoperative Wundinfektionen postoperative Wundinfektionen	Marsh-Ng, 2007 [53] Weese, 2008 [49]
<i>Clostridium difficile</i>	Enteritis mit Diarrhoe	Weese, 2003 [55]

### **2.1.2.1.2 Exogene Infektionen**

In exogene Infektionen sind meist andere Patienten, die Hände des Personals, Nagetiere (Schadnager), Arthropoden, Futternäpfe, Klinikkäfige oder Katheter involviert [44]. Die Übertragung kann durch direkten Kontakt, Kontakt mit infektiösen Körpersekreten oder über Vektoren erfolgen. Infektionen durch bakterielle Erreger, die nicht zur normalen Mikrobiota gehören oder Infektionen durch Viren, Pilze oder Parasiten bei mehreren Tieren einer Station sind exogene Infektionen, die zu regelrechten Ausbrüchen innerhalb von Kliniken führen können. Häufig beschrieben sind hier z.B. Salmonellose-Ausbrüche in Pferdekliniken, bei denen nicht selten ein großer Teil der betroffenen Tiere verstarb oder euthanasiert werden musste [56-58]. Erst kürzlich wurde auch ein Ausbruch caniner infektiöser Tracheobronchitis, verursacht durch canine Herpesviren, in einer Tierklinik publiziert, bei dem mehrere Hunde einer Station verstarben. Einige Hunde hatten im Verlaufe ihrer eigentlichen Therapie immunsupprimierende Medikamente erhalten und insbesondere ältere Tiere haben sich dann nach Übertragung der Viren in der Klinik infiziert und sind an den Folgen der Infektion verstorben [59]. Oft handelt es sich bei exogenen Infektionen und Ausbrüchen auch um Erreger mit zoonotischem Potential, die direkt auf den Menschen übertragen werden können und schon aus arbeitsschutz-rechtlicher Sicht besondere Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz vor Transmission erforderlich machen. Diese Erreger können nach Greene et al. in vier verschiedenen Klassen eingeteilt werden, die je nach Art der zoonotischen Transmission und dem Risiko nosokomialer Verbreitung unterschiedliche Hygiene-, Isolations- und Behandlungsmaßnahmen erfordern, die sowohl das Klinikpersonal als auch die Patienten der Klinik vor einer Infektion schützen sollen (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3**

**Klassifikation von Infektionskrankheiten basierend auf ihrem zoonotischen und nosokomialen Potential**

Tabelle nach Greene et al., 2006 [44]

<b>KLASSE 1</b>	
geringes zoonotisches Potential, begrenzte Erregerausscheidung, geringe Ausbreitung zwischen Individuen;	
Beispiel	systemische Mykosen, Prototheken, systemische Herpesvirusinfektionen von Neonaten
Maßnahmen	routinemäßige Reinigung und Desinfektion, Händehygiene
<b>KLASSE 2</b>	
höheres Übertragungsrisiko, direkter, enger Kontakt zwischen Tieren bzw. Kontakt zu infektiösen Körperausscheidungen ist notwendig, Übertragung auch über Vektoren (Arthropoden), Erreger sind nicht umweltresistent, keine besondere Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen	
Beispiel	canine virale Papillomatose, feline infektiöse Peritonitis (FIP), feline Leukämie
Maßnahmen	Reinigung und Desinfektion, Händehygiene, Arthropodenbekämpfung
<b>KLASSE 3</b>	
moderate Umweltresistenz und Antibiotikaresistenz, zoonotisches Potential; Infektion durch direkten Kontakt oder infektiöse Körpersekrete	
Beispiel	Giardiose, Toxoplasmose, Leptospirose, Cryptosporidiose, Dermatophytose, resistente <i>Klebsiella</i> und <i>Pseudomonas spp.</i>
Maßnahmen	Isolation in speziell gekennzeichneten Käfigen, besondere Händehygiene und intensive Reinigung und Desinfektion der Käfige (Chlorbleiche, Phenole, Ammoniumverbindungen, QUATs), sofortiges Entfernen von Ausscheidungen (Faeces, Urin, Vomit etc.) aus den Käfigen
<b>KLASSE 4</b>	
hohes zoonotisches Potential, große Infektionsgefahr, hohe Kontagiosität der Erreger, Übertragung auch über die Luft	
Beispiel	canine Parvovirose, virale Respirationserkrankungen, andere enterische Infektionen ( <i>Salmonella spp.</i> , Shigellose), <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Maßnahmen	strenge Isolation in gesonderter Station, spezielle Schutzkleidung, Handschuhe, Überzieher für Schuhe; Abfälle separat entsorgen, besondere Käfigdesinfektion (ggf. negative Kultur oder PCR der Käfigoberfläche bevor neu belegt wird)

## 2.1.3 Spezielle nosokomiale Infektionen und ihre Bedeutung in der Tiermedizin

### 2.1.3.1 Infektionen durch intravenöse Katheter

Über die Inzidenz katheter-assoziiertes Infektionen bei Tieren gibt es wenig dokumentierte Daten, dennoch sind einige Berichte über Ausbrüche venenkatheter-assoziiertes Infektionen bei verschiedenen Tierarten beschrieben [60] und seit wenigen Jahren auch erste Surveillance-Studien aus der Kleintiermedizin [53].

Burrows et al. konnten bereits 1982 zeigen, dass Katheter-assoziiertes Infektionen bei Hunden häufig vorkommen und dass es zudem einen signifikanten Einfluss der aseptischen Vorbereitung auf die Häufigkeit von Infektionen gibt [61]. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 1988 konnte in 26% (17 von 65) der Patienten einer Kleintierklinik mit Jugularvenenkatheter nach einer durchschnittlichen Verweildauer von 2,7 Tagen ein positiver mikrobiologischer Befund festgestellt werden [62]. Auch eine aktuellere Studie aus dem Jahr 2007 konnte mit 24.5% positiven Kulturen von insgesamt 151 untersuchten Kathetern bei Hunden und Katzen einer Intensivstation ähnliche Zahlen belegen [53].

Verschiedene Bakterien sind häufig am Katheter-assoziierten Infektionsgeschehen bei Tieren beteiligt, meist sind sie Bestandteil der normalen Hautmikrobiota bzw. der enterischen Mikrobiota der Tiere und gelangen durch die Insertionsstelle bzw. den Katheterhub in den Blutstrom [13, 53]. Einige Studien konnten u.a. *Acinetobacter spp.*, *E. coli*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter* und *Serratia spp.* aus Katheterkulturen identifizieren, nicht selten kommen auch polymikrobielle Infektionen vor [13].

Die Haut des Patienten ist vermutlich die häufigste Erregerquelle, das heißt es findet in der Regel eine Migration der Mikroorganismen über die Insertionsstelle zwischen Hautoberfläche und Katheter (also extraluminal) mit anschließender Besiedlung der Katheterspitze statt [44], wobei hier biofilmbildende Bakterien einen Vorteil bei der Kolonisation des Kathetermaterials besitzen. Antibakteriell imprägniertes Kathetermaterial (z.B. Silberimprägnation) bzw. Katheter aus Vialon, Silikon oder Polyurethan sollen die Anheftung und Biofilmbildung von Bakterien am Katheter reduzieren [63-65].

Dennoch kommen auch weitere Erregerquellen beim Entstehen von Katheter-assoziierten Infektionen in Betracht, z.B. kontaminierte Infusionen oder Medikamente [44]. Die Kontamination von Infusionslösungen und Medikamenten führt in der Regel zu einer intraluminalen Besiedelung des Katheters. Besonders bei Infusionen zur parenteralen Ernährung sind mikrobielle Kontaminationen möglich. So sind verschiedene Enterobacteriaceae (z.B. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) in der Lage bei Raumtemperatur in Dextroslösung zu wachsen und können dort Konzentrationen von  $10^5$  bis  $10^6$  Organismen pro ml erreichen, ohne dass der Lösung dies anzusehen ist [44]. *Pseudomonas spp.* können in destilliertem Wasser, in Kochsalzlösung und sogar in Iodophoren wachsen [66] und auch in gekühlten Blutkonserven sind *Pseudomonas spp.* und *Serratia spp.* isoliert worden [67]. Auch Lipid-Emulsionen wie z.B. bestimmte Lipid-

basierte Kurzzeitnarkotika können das Wachstum von verschiedenen Mikroorganismen fördern und zu einer Infektion des Patienten führen [68, 69].

Schließlich stellt auch das Klinikpersonal selbst eine entscheidende Erregerquelle dar und kann z.B. über kontaminierte Hände oder Schermaschinen zu einer Katheter-assoziierten Infektion beitragen [12, 13].

### **2.1.3.2 Katheter-assoziierte Harnwegsinfektionen**

Katheter-assoziierte Harnwegsinfektionen sind in einigen kleintiermedizinischen Studien dokumentiert [70, 71]. Harnwegskatheter unterbrechen die natürliche Barrierefunktion des Urogenitaltrakts, die unter anderem auf dem Ausspülen von Mikroorganismen beruht. Durch den urinableitenden Harnwegskatheter bekommen Mikroorganismen Zugang zur Blase und dem oberen Urogenitaltrakt, der physiologisch steril ist. Die distale Urethra sowie Präputium und Vagina hingegen sind bei allen Tieren natürliche Habitate von Kommensalen. Urinableitende Dauerkatheter ermöglichen eine retrograde Migration dieser kommensalen Bakterien aber auch Keimen aus der umgebenden Umwelt und bilden damit die Vorraussetzung für eine mögliche Infektion des gesamten Urogenitaltraktes. Oft entwickeln sich zunächst nosokomiale Bakteriurien, die häufig auch asymptomatisch sind. Diese Tiere verbreiten unter Umständen multiresistenter Erreger, die Oberflächen in der Klinik sowie andere Patienten kontaminieren können [13]. Studien haben gezeigt, dass 32% bis 52% der Kleintiere innerhalb weniger Tage nach Katheterisation eine Bakteriurie entwickeln [62, 72]. Morphologische Veränderungen in der Urethra, milde Urethritiden oder Veränderungen der Blasenschleimhaut können auch bei gesunden Tieren innerhalb weniger Tage nach der Katheterisation beobachtet werden und begünstigen bakterielle Kolonisation und Infektionen [72]. Durch vorangegangene Antibiose kann es in Folge von Selektionen zum verstärkten Ausscheiden von resistenten Bakterien kommen, weshalb man nosokomiale Harnwegsinfektionen häufig in Assoziation mit multiresistenten Darmbesiedlern wie *E. coli*, *Klebsiella spp.* oder *Enterobacter spp.* beobachtet. In einer kanadischen Tierklinik wurden in 10% aller positiven Urinkulturen von Hunden mit Harnwegskatheter der Intensivstation *E. coli* isoliert. Im Falle von antibiotischer Vorbehandlung der Hunde mit Ampicillin oder Cephalosporin wurden in diesen Isolaten zudem häufig Multiresistenzen festgestellt [54] und auch multiresistente *Klebsiella spp.* sind aus Infektionen des Urogenitaltraktes von Tieren beschrieben [73]. Besonders bei Langzeitkathetern sind auch polymikrobielle Infektionen häufig beschrieben. Urease-produzierende Bakterien wie *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* oder *Pseudomonas spp.* können zudem den lokalen pH-Wert im Urogenitaltrakt ins Alkalische verschieben und führen durch diese Alkalisierung zu Mineralablagerungen im Katheterbiofilm (z.B. Calcium-Phosphat, Struvit, Ammoniumphosphat), die den Katheter innerhalb weniger Tage blockieren können [74]. Durch Manipulation am Katheter infizierter Patienten oder Verletzungen der Blasenschleimhaut sind zudem auch transiente Bakteriämien möglich [13]. In humanmedizinischen Studien wurde vor allem die Dauer der Katheterisation als der größte Risikofaktor für die Entstehung von Infektionen ermittelt, und auch eine

prospektive veterinärmedizinische Studie bestätigt ein erhöhtes Risiko bei einer Verweildauer von mehr als drei Tagen [52].

### **2.1.3.3 Postoperative Wundinfektionen**

Die meisten Daten über postoperative Wundinfektionen in der Tiermedizin sind für Kleintiere, einige auch für Pferde verfügbar. Bei Kleintieren stellen postoperative Wundinfektionen, mit Prävalenzen zwischen 3,5% und 7,6% aller chirurgischen Wunden die häufigsten nosokomialen Infektionen dar [75-77]. Durch die chirurgische Inzision wird die normale Barriere der Haut oder Schleimhaut durchbrochen. Wenn geschädigtes Gewebe, z.B. in Form von lokalen Nekrosen, Hämatomen, Seromen, verletztem Weichteilgewebe, Hohlräumen oder auch Fremdkörper im Wundgeschehen involviert sind, kann die physiologische Abwehr eine bakterielle Kolonisation unter Umständen nicht mehr beherrschen und es kommt zur Infektion.

Häufige Erreger postoperativer Wundinfektionen sind Bakterienspezies, die der eigenen Haut- und Schleimhautmikrobiota angehören. Bei Kleintieren sind Koagulase-positive Staphylokokken häufige Verursacher postoperativer Wundinfektionen, aber auch *Enterococcus spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa* oder Anaerobier wie *Bacillus spp.* und *Clostridium spp.* können isoliert werden [49, 75]. Nicht selten sind bei Kleintieren und Pferden auch multiresistente Erreger aus der Klinikumgebung oder der eigenen Mikrobiota involviert, hierzu zählen vor allem Methicillin-resistente Staphylokokken (sowohl Koagulase-positive als auch- negative), *Acinetobacter spp.*, ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* und multiresistente *Enterococcus spp.* [49]. Neben der autochthonen Mikrobiota kommt eine Vielzahl weiterer Infektionsquellen für den Patienten in Betracht. Hierzu zählt vor allem der Chirurg selbst, chirurgische Instrumente und Equipment sowie die Raumluft im Operationsraum. Humanmedizinische Studien konnten Mitte der achtziger Jahre einen Anteil von 80% der postoperativen Wundinfektionen auf Bakterien der Raumluft zurückführen [78, 79]. Während in der Humanmedizin im Laufe der letzten Jahrzehnte speziell gefilterte Belüftungssysteme diesen Anteil stark senken konnten, sind in der Tiermedizin die wenigsten Einrichtungen oder gar Praxen mit solchen Systemen ausgestattet. Auch Absaug-Schläuche mit denen intraoperativ Blut oder andere Flüssigkeiten aus dem Operationsfeld abgesaugt werden, können mit Bakterien aus der Luft (*Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*) besiedelt sein. Trotz Einsatz eines Vakuumbetriebenen Systems, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Keime auf diesem Weg direkt in die Operationswunde gelangen [80].

Wie bei allen Infektionen ist auch das postoperative Wundinfektionsrisiko als ein Zusammenspiel von Exposition und Disposition zu betrachten und somit stets ein inhärentes Risiko der Chirurgie, das durch keine Maßnahme vollständig zu eliminieren ist. Einige Studien haben sich in den letzten Jahren mit der Einschätzung von Risikofaktoren für postoperative Wundinfektionen insbesondere in der Kleintiermedizin beschäftigt und signifikante Korrelationen identifiziert [81, 82].

**Der Status des Patienten**

Disponierende Faktoren von Seiten des Patienten sind vor allem sein Alter, Ernährungszustand, seine Kondition, Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, Immunerkrankungen oder bereits andere bestehende Infektionen. Auch die Zusammensetzung der Mikrobiota, insbesondere das Vorkommen multiresistenter Keime, beeinflusst das Risiko postoperativer Wundinfektionen [82].

**Die Dauer der Operation**

Die Dauer des chirurgischen Eingriffs wurde von verschiedenen kleintiermedizinischen Studien als entscheidender Risikofaktor für postoperative Wundinfektionen identifiziert [83]; [81]. Eugster et al. ermittelten eine statistische Erhöhung des Infektionsrisikos um den Faktor 1,01 mit jeder zusätzlichen Minute. Dies entspricht in etwa einer Verdoppelung des Risikos alle 70 Minuten. Ähnliche Ergebnisse ergab eine epidemiologische Studie mit 1255 Hunden und Katzen, laut der sich das Infektionsrisiko eines 90min dauernden Eingriffs im Vergleich zu einer 60minütigen Operation verdoppelt [82]. Zeitaufwendige Eingriffe verlängern die Exposition der offenen Wunde gegenüber mikrobiologischer Kontamination und involvieren möglicherweise auch größere Gewebeschädigungen, die wiederum die Abwehrmechanismen der Wunde reduzieren.

**Die aseptische Vorbereitung und das Scheren des Operationsfeldes**

Neben einer strikt aseptischen Technik in der Vorbereitung des Patienten, des Chirurgen und des benötigten Instrumentariums, ist vor allem das Scheren bzw. Rasieren des Fells bei Tieren ein Risikofaktor. Dies betrifft vor allem den Zeitpunkt der Rasur. Brown et al. ermittelten, dass Tiere, deren Operationsgebiet nicht erst nach Narkoseeinleitung, also unmittelbar vor Beginn des Eingriffs, sondern schon im Verlaufe des Tages bzw. einige Stunden vor der Operation geschoren wurde, dreimal häufiger postoperative Wundinfektionen entwickeln [82]. Die Ursache dafür wurde in humanmedizinischen Studien in Mikroverletzungen und kleinen Abrasionen der Haut erkannt, die eine bakterielle Kolonisation der Haut im Operationsgebiet ermöglichen [84]. Generell verursacht das Rasieren der Haut stärkere Hautirritationen und Mikroläsionen als das Scheren bzw. Abschneiden des Fells.

**Die Dauer der Anästhesie**

Unabhängig von der Operationsdauer ist auch die Dauer der Anästhesie ein entscheidender Risikofaktor [83]. Die zentralnervöse Depression aufgrund der Anästhesie bewirkt eine perioperative Hypothermie und führt zur Beeinträchtigung der phagozytotischen Funktion, zu einem Blutdruckabfall und unter Umständen zu einer Hypoxie. Die körpereigene Immunabwehr erfordert eine intakte Perfusion des verletzten Gewebes, um Sauerstoff und Immunzellen bereit zu stellen. Eine verminderte Durchblutung infolge der kreislaufdepressiven Wirkung der Anästhesie kann zu reduzierter Geweberegeneration und zu einem erhöhten Risiko bakterieller Infektionen führen. In sauberen Wunden erhöht sich das Infektionsrisiko statistisch mit jeder zusätzlichen Stunde der Anästhesie um 30% [81, 85].

**Der Zustand des operierten Gewebes und der Grad der Kontamination**

Es ist zwar eine klare Korrelation zwischen den vier Kategorien der Wundkontamination und dem Risiko einer Wundinfektion festzustellen (sauber: 2,5%; sauber-kontaminiert: 2,5% bis 4,5%; kontaminiert: 5,8 bis 21%), dennoch ist alleine diese Klassifikation für eine Einschätzung des Infektionsrisikos nicht ausreichend, weil eine Vielzahl weiterer Faktoren bedeutend sind [81, 82].

**Die Anzahl der Personen im Operationsraum**

In einem Operationsraum, in dem sich Menschen befinden sind statistisch betrachtet zwölf Mal mehr Bakterien vorhanden, als in einem leeren Operationsraum [86]. In Kleintierkliniken erhöht jede zusätzliche Person im Operationsraum das Infektionsrisiko des Patienten um den Faktor 1,3 [81]. Vor allem in Universitätskliniken kann dies entscheidend sein, da besonders schwierige und außergewöhnliche Operationen nicht selten viele studentische Zuschauer oder Assistenzärzte anziehen und damit gleich mehrere Risikofaktoren (Schwere der Erkrankung, Anästhesie, Operation, Personenzahl im OP) vereinen. Generell sollten während Operationen Personenverkehr, Gespräche und Bewegungen auf ein Mindestmaß reduziert werden, um das Risiko mikrobiologischer Kontamination zu minimieren.

**Der Einsatz von Propofol**

Eine Studie mit 863 untersuchten Fällen aus dem Jahr 1999 ermittelte eine signifikante Assoziation zwischen dem Gebrauch des Kurzzeit-Injektionsnarkotikums Propofol und der Häufigkeit postoperativer Wundinfektionen bei Hund und Katze [68]. Tiere, denen zur Narkoseeinleitung Propofol injiziert wurde, entwickelten durchschnittlich 3,8-mal häufiger postoperative Wundinfektionen. Als Ursache dafür wurde eine mikrobielle Verunreinigung vermutet, die vor allem durch die Darreichungsform als Öl-in-Wasser-Emulsion begünstigt wird und sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin auch in Verbindung mit Septitiden beschrieben ist [69].

**Die Dauer des Klinikaufenthaltes bzw. des Aufenthalts auf der Intensivstation**

Eugster und Kollegen ermittelten 2004 eine Erhöhung des Risikos postoperativer Wundinfektionen um den Faktor 1,16 für jeden zusätzlichen Tag des Patienten auf der Intensivstation [81]. Häufig sind multiresistente Mikroorganismen in Intensivstationen präsent und der geschwächte Zustand der Intensivpatienten prädisponiert diese zusätzlich für Infektionen [12].

**Präoperative, perioperative und postoperative Antibiose**

Eine prä- bzw. intraoperative antibiotische Prophylaxe hat sich als wichtiger protektiver Faktor gegenüber postoperativen Wundinfektionen gezeigt. Patienten, die eine antimikrobielle Prophylaxe im Rahmen ihrer Operation erhielten, entwickelten 6- bis 7-mal seltener postoperative Wundinfektionen als Patienten ohne Prophylaxe [81]. Eine Studie über orthopädische Eingriffe bei Hunden zeigte, dass eine perioperative Gabe von Penicillin/Cefalozin 30 Minuten vor Beginn der Operation und eine zweite Verabreichung bei Überschreitung der Operationsdauer von 90 Minuten, zu einer deutlich verminderten

Infektionsrate führt. Im Anschluss an den Eingriff wurden keine weiteren Antibiotika verabreicht [87]. Dennoch ist der routinemäßige Einsatz antibiotischer Prophylaxe besonders bei sauberen Wunden umstritten. In der Regel erfordern saubere Operationswunden, die unter strikt aseptischer Technik versorgt werden, keine prophylaktische Antibiose, es sei denn es handelt sich um prothetische Operationen oder neurochirurgische Eingriffe [12].

Eine längerfristige postoperative Verabreichung antimikrobieller Wirkstoffe stellt hingegen einen erhöhten Risikofaktor für postoperative Wundinfektionen dar und sollte, wenn möglich, vermieden werden [82].

#### **2.1.3.4 Infektionen des Respirationstraktes**

Nosokomiale Infektionen des Respirationstraktes sind in aller Regel assoziiert mit Manipulationen wie intratrachealer Intubation, mechanischer Ventilation, Tracheotomie oder Endoskopie [88, 89]. Die natürliche Barrierefunktion des oberen Respirationstraktes, die das Eindringen inhalierter Partikel in den tieferen Respirationstrakt verhindert, wird von diesen Prozeduren umgangen. So gelangt eine erhöhte Anzahl von Mikroorganismen in den tieferen Respirationstrakt, was die Entstehung von Infektionen begünstigt. Intratracheale Intubation und mechanische Ventilation finden in der Veterinärmedizin vor allem in großen Kliniken (z.B. Universitätskliniken) oder spezialisierten Überweisungspraxen statt. Auch wenn in der Tiermedizin meist nur während der Operation künstlich beatmet wird, kommen nosokomiale Pneumonien infolge längerer künstlicher Ventilation auch bei Kleintieren vor [13]. Ähnlich wie bei Humanpatienten können womöglich auch in der Kleintiermedizin zwei Formen der Beatmungs-assoziierten Pneumonie unterschieden werden [90]. Die frühe Form etabliert sich während der ersten vier Tage nach Intubation und wird meist durch Gram-positive Bakterien verursacht, die zur physiologischen Mikrobiota des Oropharynx gehören (z.B. *S. pneumoniae* oder *S. aureus*). Nach drei bis fünf Tagen Aufenthalt auf der Intensivstation verändert sich die Mikrobiota des Oropharynx und es erfolgt einerseits eine retrograde Besiedelung mit Gram-negativen Bakterien des Gastrointestinaltraktes und andererseits eine Besiedelung mit häufig multiresistenten Organismen aus der Klinikumgebung [91]. Diese häufigere, späte Form ist dann meist verursacht durch gram-negative Bakterien und ist häufig resistent gegenüber antimikrobieller Therapie. Involviert sind zum Beispiel *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* oder auch MRSA [92-94]. Auch bei Tieren ist davon auszugehen, dass nach einigen Tagen Klinikaufenthalt der Oropharynx mit resistenten Bakterien der Umgebung besiedelt ist, und entstehende Pneumonien sich als resistent gegenüber antimikrobieller Therapie erweisen [12, 13]. Bei Tieren spielen neben Beatmungs-assoziierten Pneumonien auch Aspirationspneumonien eine Rolle, vor allem bei liegenden, geschwächten Tieren mit Vomitus [13]. Neben der künstlichen Beatmung kommen auch Inhalatoren und Zerstäuber als Quelle nosokomialer Pneumonien in Betracht und sollten nach jedem Gebrauch gereinigt, desinfiziert und getrocknet werden um eine Verbreitung pathogener Mikroorganismen zu vermeiden [95].

### 2.1.3.5 Gastrointestinale Infektionen

Nosokomiale Infektionen des Gastrointestinaltrakts geschehen meist ausbruchsartig und betreffen dann viele Tiere der Klinik bzw. Station. Häufig beteiligt daran sind *Salmonella spp.* oder enterotoxische Clostriden, die über verschiedene Vektoren zwischen den Klinikpatienten übertragen werden. Während eines besonders drastischen Ausbruchs in einer universitären Pferdeklinik in Michigan State im Jahr 2001, in dessen Verlauf 8 von 18 betroffenen Pferden starben oder euthanasiert wurden, musste die Klinik kurzfristig vollkommen geschlossen werden, um weitere Infektionen zu verhindern und eine gründliche Reinigung und Desinfektion zu ermöglichen [96]. Enterotoxische Clostridien Spezies sind bei Pferden ebenfalls im Zusammenhang mit nosokomialen Ausbrüchen beschrieben [97]. Auch bei Hunden und Katzen sind nosokomiale Ausbrüche verursacht durch Salmonellen oder durch enterotoxische Clostridien beschrieben [55, 98-100]. Hunde und Katzen können zudem sehr häufig auch unbemerkt Träger dieser Erreger sein [101-103]. Risikofaktoren, die zur Infektion führen, sind bei diesen Erregern ebenfalls verlängerte Klinikaufenthalte sowie enterale und /oder parenterale Antibiose [101, 104]. Andere Erreger, die zu nosokomialen Ausbrüchen führen können, sind Parvoviren, Coronaviren, Giardien oder auch Cryptosporidien [44; 105]. Schlechte sanitäre Ausstattung, überfüllte Warteräume und Stationen sowie inadäquate Desinfektion begünstigen die Ausbreitung zwischen Patienten und das Entstehen von Ausbrüchen. Tiere mit gastrointestinalen Symptomen wie akutem Erbrechen und Diarrhö sollten als Infektionsquelle betrachtet, entsprechend behandelt und vor allem von anderen Patienten isoliert werden. Vor einer neuen Belegung von Boxen oder Käfigen kann in einigen Fällen nach intensiver Reinigung und Desinfektion (z.B. mit Chlorbleiche) auch ein negativer Kultur- oder PCR-Befund abgewartet werden, um weitere Infektionen zu vermeiden [44].

## 2.2 Staphylokokken

Staphylokokken gehören zur Familie der *Micrococcaceae* und werden molekular-taxonomisch in das breite Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus- Cluster eingeordnet [106]. Die typische traubenförmige Anordnung der 0,5-1,5 µm großen, gram-positiven Kugelbakterien im mikroskopischen Präparat führte zur Namensgebung *Staphylococcus* (griechisch: „Traube“). Gegenwärtig umfasst das Genus *Staphylococcus* in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) 72 Spezies und Subspezies (DSMZ, Stand August 2010). Staphylokokken sind unbeweglich, bilden keine Sporen, wachsen auf einfachen Nährmedien und zeichnen sich durch eine sehr hohe Umweltresistenz mit Überlebenszeiten von bis zu mehreren Monaten aus. Die Eigenschaft, das antioxidative Schutzenzym Katalase zu produzieren, grenzt die Staphylokokken von den kulturmorphologisch ähnlichen Streptokokken ab [106].

Klinisch und diagnostisch wird häufig unter anderem die Expression der Plasmakoagulase zur ersten, groben Differenzierung der verschiedenen Staphylokokken- Spezies herangezogen. Bei der Koagulase handelt es sich um ein extrazelluläres Protein, das in der Lage ist, mit Prothrombin einen Komplex zu bilden (Staphylothrombin). Dieser Komplex wiederum aktiviert die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen, so dass es durch die Entstehung von Fibrinnetzen und -klümpchen zu idealen Anheftungs- Voraussetzungen für die Staphylokokken kommt [106]. Häufig werden deshalb Koagulase-positive Staphylokokken-Spezies, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, als virulenter und klinisch bedeutsamer eingestuft. Neben *S. aureus* können auch *S. hyicus* (Stamm-abhängig) und *S. schleiferi subsp. coagulans* Koagulase exprimieren, und auch die Staphylokokken-Spezies der intermedius-Gruppe (*S. intermedius*; *S. pseudintermedius* und *S. delphini*) gehören zu den Koagulase-produzierenden Spezies.

Viele Staphylokokkenspezies haben sich bestimmten Wirten angepasst, so hat sich *S. aureus* schon früh evolutionär sehr gut an Primaten adaptiert während *S. (pseud)intermedius* sich vornehmlich als Besiedler von Carnivoren entwickelt hat [107, 108]. Einzelne Biotypen oder spezifische Ökovare beider Spezies sind aber auch auf andere Wirte, wie Vögel oder andere domestizierte Tierarten spezialisiert. Staphylokokken sind oftmals Bestandteil der Normalmikrobiota auf Haut und Schleimhäuten, des Respirationstraktes, oberen Verdauungs- und Harntraktes bei Säugetieren und Vögeln. Bei Menschen sind sie darüber hinaus häufige Verursacher nosokomialer Infektionen und als solche unter anderem an Infektionen der Harnwege, Bakteriämien, Wundinfektionen oder Pneumonien beteiligt [1, 33]. Bei verschiedenen Tierarten sind Staphylokokken häufig an der Entstehung eitriger Prozesse beteiligt, v.a. nach Eintritt in tiefere Gewebeschichten wie z.B. in Folge von Biss- oder Kratzwunden, nach Verbrennungen oder Ektoparasitenbefall, [106, 108, 109].

## 2.2.1 Taxonomische Einordnung und phänotypische Charakteristika der *Staphylococcus intermedius*- Gruppe (SIG)

Als *Staphylococcus intermedius* im Jahre 1976 von Hajek et al. erstmals beschrieben wurde, erkannte man an dieser Spezies Eigenschaften, die bis dahin als typisch für *Staphylococcus aureus* galten, wie z.B. die Expression von Koagulase, DNase und Hämolytinen. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu *S. aureus* und seiner Eigenschaft als typischer opportunistischer Hautbesiedler von Hunden, wurde *S. intermedius* in der frühen Systematik häufig als canine Standortvarietät von *S. aureus* beschrieben [110].

Studien, die mithilfe der Ribotypisierung die Diversität von *S. intermedius* untersucht haben, konnten 1995 zeigen, dass sich die Spezies *S. intermedius* aus mindestens drei großen Clustern zusammensetzt, und die untersuchten caninen Stämme demselben Cluster angehören [111]. Weitere Studien zeigten, dass die Spezies sehr divers erscheint und aus mehreren Biotypen besteht, die teilweise auch wirtsspezifisch sein könnten [112, 113]. Mithilfe einer DNA-basierten Typisierungsmethode, die auf Längenunterschieden der Region zwischen der 16S und der 23S rRNA verschiedener Stämme beruht, konnten Bes et al. in 57 *S. intermedius* Stämmen verschiedener Wirtsspezies insgesamt 12 verschiedene Typen identifizieren, und weiterhin zeigen, dass humane und canine Stämme denselben beiden Typen angehören [114, 115]. Als dann im Jahr 2005 *S. pseudintermedius* als eigenständige Spezies aus verschiedenen Tierarten isoliert wurde [116], ergaben phylogenetische Untersuchungen einer japanischen Studie mittels DNA-Sequenzanalyse der *housekeeping*-gene *sodA* und *hsp60*, dass Isolate, die ursprünglich als *S. intermedius* identifiziert wurden, sich eigentlich aus den Spezies *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* und *S. delphini* zusammensetzen, und diese drei Spezies möglicherweise in der Vergangenheit nicht eindeutig diagnostisch differenziert wurden [117]. Die drei Spezies werden aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft seit einiger Zeit zur *Staphylococcus intermedius*- Gruppe (SIG) zusammengefasst.

Bannoehr und Kollegen konnten durch Sequenzanalysen mehrerer *housekeeping*-Gene (*cpn60*, *pta*, *agrD*, 16SrRNA, *tuf*) in 105 Stämmen der SIG zeigen, dass *S. pseudintermedius* häufiger isoliert wird als bislang angenommen: alle caninen Isolate erwiesen sich als *S. pseudintermedius* und von insgesamt 105 untersuchten Isolaten konnten 89 als *S. pseudintermedius* und nur vier als *S. intermedius* identifiziert werden, elf weitere Stämme gehörten der Spezies *S. delphini* an. Die große phänotypische Ähnlichkeit von *S. intermedius* und *S. pseudintermedius* hat dazu geführt, dass diese beiden Spezies bisher in der routinemäßigen mikrobiologischen Diagnostik häufig verwechselt und *S. pseudintermedius* in der Regel als *S. intermedius* missidentifiziert wurde [118]. Über die Prävalenz von *S. delphini* gibt es bisher kaum Daten; Bannoehr und Kollegen identifizierten insgesamt 11 *S. delphini* aus Proben von Kamelen, Pferden und Tauben. Im Zuge der Reklassifizierung von 117 SIG-Stämmen, die phänotypisch als *S. intermedius* identifiziert wurden, konnte 2007 gezeigt werden, dass auch *S. delphini* häufig fälschlicherweise als *S. intermedius* identifiziert wurde [117]. Während Isolate von wildlebenden Tauben tatsächlich zur Spezies *S. intermedius* gehörten, stellten sich vor allem Isolate von Zuchttauben häufig als *S. delphini*

heraus. Eine norwegische Studie konnte *S. delphini* weiterhin als Erreger im Fall einer bovinen Mastitis isolieren [119].

*S. intermedius* scheint insgesamt eine geringere klinische Bedeutung zu haben als bislang angenommen, und so wurde kürzlich vorgeschlagen, canine Stämme der SIG als *S. pseudintermedius* zu berichten, solange nicht durch genomische Untersuchungen eine andere Spezies diagnostiziert wurde [120]. Weiterhin muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei früheren Studien und Publikationen zu *S. intermedius* häufig tatsächlich um *S. pseudintermedius* handelte.

Im Folgenden wird aus diesem Grund die Schreibweise *S. (pseud)intermedius* für Referenzen aus Studien und Quellen verwendet, in denen aus heutiger Erkenntnis nicht mehr eindeutig feststeht, dass es sich tatsächlich um *S. intermedius* und nicht um *S. pseudintermedius* handelt.

Für die routinemäßige mikrobiologische Diagnostik wurde zur Speziesdifferenzierung innerhalb der SIG im Rahmen dieser Arbeit neben anderen Charakteristika die enzymatische Aktivität von DNase und Arginindihydrolase untersucht. *S. pseudintermedius* zeigt sich dabei in empirischen Studien für beide Charakteristika positiv, *S. intermedius* zeigt keine Arginindihydrolase-Aktivität und *S. delphini* ist DNase-negativ (siehe Tabelle 4).

Eine Bestätigung phänotypischer Differenzierungsergebnisse kann durch genotypische Verfahren, zum Beispiel durch DNA-Sequenzanalyse definierter *housekeeping*-Gene, erfolgen. Eine 2009 veröffentlichte Studie hat außerdem eine einfache Nachweismethode mittels PCR-Restriktions-Fragment Längen Polymorphismus etabliert, die eine sichere Differenzierung von *S. pseudintermedius* gegenüber anderen Koagulase-positiven Staphylokokken-Spezies ermöglicht [121], und auch ein auf dem *nuc*-Gen basierender Multiplex-PCR-Ansatz zur Differenzierung Koagulase-positiver Spezies wurde kürzlich publiziert [122].

**Tabelle 4**

**Phänotypische und biochemische Charakteristika von *Staphylococcus spp.* der intermedius Gruppe (SIG) und *S. aureus ssp. aureus***

Tabelle nach: Devriese et al., 2005 [116]; Sasaki et al. 2007[117];Van Hoovels et al. 2006 [123]

Charakteristika	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. delphini</i>	<i>S. aureus subsp. aureus</i>
Katalase	+	+	+	+
Koagulase	+	+	+	+
Clumping Factor	-	v	-	+
DNase	+	+	-	+
Arginin-Dihydrolase	+	-	+	+
β-Hämolyse	+	+	n.t.	v
Pigmentbildung	-	-	-	+
Maltose	+	-(+)	+	+
Saccharose	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	-	+
D-Xylose	-	-	-	-
D-Mannitol	-	+	-	+
(anaerob)				
Polymyxin E	R	S	S	R
Novobiocin	S	S	v	S
Acetoin (Voges-Proskauer)	+	(+)	-	+

**Abkürzungen:**

**+**: positiv; **-**: negativ; **(+)**: schwache Reaktion; **v**: variabel bzw. Stamm-abhängig; **n.t.**: nicht getestet;  
**R**: resistent; **S**: sensibel

**2.2.2 Bedeutung von *S. (pseud)intermedius* als Krankheitserreger**

*Staphylococcus (pseud)intermedius* gilt als häufiger und typischer Besiedler der Haut von verschiedenen Tierarten, insbesondere von Hunden und Katzen, aber auch als fakultativ pathogener Erreger, der typischerweise aus Otitiden und Pyodermien, sowie aus purulenten Gelenkentzündungen, Pyometritiden, oder Infektionen der Augenlider und Konjunktiven isoliert wird [109, 124]. In vielen Studien wurde *S. (pseud)intermedius* als der häufigste dauerhafte und/oder transiente Besiedler des Hundes beschrieben, wobei insbesondere die Haut und das Haarkleid, Schleimhäute wie Vestibulum nasi und Gingiva sowie der äußere

Gehörgang und das Perineum als primäre Besiedlungsorte genannt sind [125-128]. Einige Studien identifizierten *S. (pseud)intermedius* als die am häufigsten isolierte Koagulase-positive Staphylokokken-Spezies bei Hund und Katze [129, 130]. Insbesondere im Zusammenhang mit entzündlichen caninen Hauterkrankungen, wie der oberflächlichen bakteriellen Follikulitis sowie der tiefen Pyodermie, ist *S. (pseud)intermedius* als häufiger Erreger beschrieben [131]. Eine weitere Studie konnte kürzlich belegen, dass *S. pseudintermedius* auch bei externen Otitiden die am häufigsten isolierte Koagulase-positive Staphylokokkenspezies ist [132].

Die von Devriese et al. im Jahr 2005 erstmalig beschriebenen und eindeutig identifizierten *S. pseudintermedius* Typ-Stämme wurden aus Gewebeläsionen verschiedener Tierarten isoliert: aus dem Lungengewebe einer Katze, aus der Hautläsion eines Pferdes, aus dem äußeren Gehörgang eines Hundes der an Otitis externa erkrankt war sowie aus der Leber eines Papagei [116].

Der Mensch ist selten mit *S. (pseud)intermedius* besiedelt [133], allerdings konnte gezeigt werden, dass Personen, die in ständigem Kontakt zu Hunden und Katzen leben häufiger mit *S. (pseud)intermedius* kolonisiert sind [134-136] als Menschen ohne Kontakt, was eine Transmission zwischen Tier und Mensch vermuten lässt. Vor allem in Verbindungen mit Hundebissen ist *S. (pseud)intermedius* als Infektionserreger beim Menschen beschrieben [127, 137, 138].

Ein Fallbericht aus dem Jahr 2006 identifizierte *S. pseudintermedius* als Infektionserreger in einem 60-jährigen Patienten, dessen Herzschrittmacher in Folge einer eitrigen Infektion ausgetauscht werden musste [123]. Allerdings ließ sich in diesem Fall kein direkter Kontakt zu Hunden oder Katzen als Haustiere nachweisen. Auch als Erreger von Katheter-assoziierten Bakteriämien, Endokarditiden und Pneumonien wurde *S. (pseud)intermedius* in der Vergangenheit beim Menschen vereinzelt beschrieben, [139-141]. Dennoch scheinen ernsthafte Infektionen des Menschen mit *S. (pseud)intermedius* eine seltene Erscheinung zu sein.

Tanner et al. berichteten einen Fall von Otitis externa bei einer Patientin, aus deren Ohrsekret *S. (pseud)intermedius* isoliert wurde. Durch den Vergleich von 16S- ribosomaler DNS und Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen konnte ein Stamm mit identischen Charakteristika auch bei ihrem Hund nachgewiesen werden, was möglicherweise auf eine zoonotische Infektion der Patientin hinweist [142]. In einer dänischen Studie aus dem Jahr 2003 wurden in sechs Fällen von caniner Pyodermie, verursacht durch multiresistente *S. (pseud)intermedius*, identische Stämme bei den Hunden und ihren Besitzern mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) nachgewiesen [143], was als deutlicher Hinweis für eine Transmission zwischen Hund und Besitzer gilt. Die Besiedlung des Menschen mit *S. (pseud)intermedius* scheint dennoch in der Regel asymptomatisch zu verlaufen und meist transient zu sein [133, 144, 145].

### 2.2.3 Virulenzfaktoren und Quorum sensing von SIG

Einige Staphylokokken-Spezies sind in der Lage verschiedenste Virulenzmerkmale zu exprimieren, wie z.B: Hämolysine ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -Hämolysine), exfoliative Toxine, verschiedene Proteasen, Staphylokinase, eine Reihe von Enterotoxinen, Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin (TSST) oder auch Fibronectin-, Elastin- oder Kollagenbindende Proteine [146-148].

*S. pseudintermedius* ist in der Lage an Fibronectin, Fibrinogen und Cytokeratin zu binden, hat also möglicherweise Oberflächen-Adhäsine, die die Erkennung und Bindung an zelluläre adhäsive Moleküle ermöglichen und denen von *S. aureus* ähneln [149]. Auch eine Wirtsspezifische Adhärenz gegenüber kaninen Corneozyten konnte für *S. (pseud)intermedius* gezeigt werden [150]. Neben der Katalase, Koagulase, Proteasen und DNase ist auch *S. (pseud)intermedius* in der Lage verschiedene weitere virulenzassoziierte Merkmale zu exprimieren, darunter auch Enterotoxine, wie die Staphylococcal enterotoxine (SE) A; B und C. Insbesondere bei Isolaten vom Hund ist SE-C beschrieben (SE-C<sub>canine</sub>) [116, 151]. Bei *S. (pseud)intermedius* Isolaten von Hunden mit Pyodermie sind diese Enterotoxine häufig einzeln oder auch in Kombination nachgewiesen worden [152, 153]. Ein weiteres spezifisches Enterotoxin ist das *S. intermedius* Enterotoxin SE-int [154]. Enterotoxinbildende *S. (pseud)intermedius* wurden 1991 mittels PFGE als ätiologisches Agens eines Lebensmittel-assoziierten Ausbruchs im Westen der USA identifiziert, in den insgesamt 265 Fälle involviert waren [155]. Die von Staphylokokken gebildeten Enterotoxine fungieren zudem nicht selten als immunaktivierende Superantigene, die im Wirt eine unspezifische T-Zell-Proliferation bewirken [156]. Dies ist auch für canine Pyodermie-assoziierte *S. (pseud)intermedius* – Isolate in Verbindung mit caninen T-Zellen beschrieben [153].

In *S. pseudintermedius* wurde außerdem ein putatives Protein A (kodiert durch *spa*) identifiziert, das vermutlich ähnlich wie bei *S. aureus* oberflächenassoziiert auftritt. Es besitzt drei Immunglobulin-bindende Domänen, mit denen es am Fc-Stück von IgG binden kann. Die Opsonierung durch das Immunsystem des Wirts wird dadurch gehemmt und das Binden phagozytischer Zellen erschwert [157].

Auch ein spezifisches exfoliatives Toxin (SIET), das insbesondere in Verbindung mit Haut- und Wundinfektionen sowie externen Otitiden eine Rolle spielt, und ein sekretorisches Leukotoxin (Luk-I), können von *S. (pseud)intermedius* exprimiert werden [158]. Über die genaue Bedeutung und Funktion von Luk-I sind bislang nur begrenzt Informationen verfügbar. Allerdings bestehen morphologische und möglicherweise auch funktionelle Analogien zwischen Luk-I von *S. (pseud)intermedius* und Panton-Valentine-Leukozidin (PVL) von *S. aureus*. PVL ist ebenfalls ein sekretorisches Leukotoxin, das einige *S. aureus* Stämme exprimieren können. Es besteht aus zwei Komponenten (LukS-PV und LukF-PV) und induziert Plasmamembranporen in polymorphkernigen Zellen, Makrophagen und Monozyten. PVL- produzierende *S. aureus*- Stämme verursachen nekrotische Prozesse, wie z.B. Dermatonekrosen oder nekrotisierende Pneumonien, häufig besonders bei Kindern oder älteren Menschen, verbunden mit letalem Infektionsfortschritt [159, 160]. Auch Luk-I besteht aus zwei Komponenten (LukS und LukF) und eine japanische Studie konnte eine sehr hohe cytotoxische Aktivität von Luk-I positiven *S. (pseud)intermedius*-Isolaten sowohl gegenüber

Kaninchen-Leukozyten wie auch gegenüber humanen Leukozyten zeigen [161]. Diese Analogien lassen vermuten, dass Luk-I in *S. (pseud)intermedius* eine ähnliche klinische Bedeutung haben könnte wie PVL in *S. aureus*.

Eine jüngst veröffentlichte Studie konnte zudem ein spezifisches exfoliatives Toxin für *S. pseudintermedius* identifizieren (EXI), das vermutlich am Entstehen von Hautläsionen und Entzündungsprozessen ursächlich beteiligt ist [162].

*S. (pseud)intermedius* produziert Beta- und Delta- Hämolysin [163] und verursacht auf Schafblutagar eine typische doppelzonige Hämolyse. Das von *S. (pseud)intermedius* produzierte  $\beta$ -Hämolysin hat zudem, ähnlich wie bei *S. aureus*, eine hohe Sphingomyelinase-Aktivität [164].

Neben der Fähigkeit sich in Biofilmen zu organisieren [165], ist *S. pseudintermedius* zudem in der Lage über Quorum sensing die Expression bestimmter Gene, die an der Kolonisation und Infektion beteiligt sind, für die gesamte Bakterienpopulation zu synchronisieren. Quorum sensing ist ein Kommunikationsmechanismus, der es Bakterien ermöglicht, kollektiv zu agieren. Hierbei werden kleine Moleküle (Polypeptide), so genannte auto-inducing Polypeptide (AIP), in die Umgebung abgegeben. Mittels spezifischer Rezeptoren können Bakterienzellen in der Umgebung die Menge dieser Moleküle und damit die aktuelle Bakterienzell-dichte ihrer Spezies wahrnehmen. Bei Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes der AIP-Konzentration wird die Genregulation der Bakterienzellen verändert und damit die Eigenschaften der gesamten Population synchronisiert [166]. Beim Quorum sensing wird die Expression von virulenz-assoziierten Genen reguliert, und den jeweiligen Gegebenheiten beim Infektionsprozess angepasst [167]. Während zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase vor allem die Expression Zellwand-gebundener Proteine, die die Adhäsion und Kolonisation ermöglichen, erhöht wird, wird post-exponentiell kollektiv die Transkription von sezernierten Exoproteinen hoch reguliert um die Infektion und damit eine weitere Verbreitung der Bakterien im Wirt zu ermöglichen [168]. Es findet also die Synthese bestimmter Virulenzfaktoren nur in Situationen statt, in denen diese Faktoren auch tatsächlich benötigt werden, was einen ökonomischen Vorteil bietet und unnötige metabolische Belastung der Bakterien vermeidet. In Staphylokokken werden die speziesspezifischen AIPs und die zugehörigen membrangebundenen Rezeptoren durch den accessory gene regulator (*agr*)-Locus kodiert. Bei *S. aureus* ist bekannt, dass z.B. Hämolysine, Enterotoxine, exfoliative Toxine, Enzyme und Oberflächenproteine durch den *agr*-Locus reguliert werden; und mithilfe dieser Exotoxine interzelluläres Bindegewebe und Parenchymzellen lysiert werden und ein invasives Vordringen der Bakterienzellen ermöglicht wird [169]. Für *S. (pseud)intermedius* wurde bereits gezeigt, dass die Transkription des virulenzassoziierten Operons Luk-I und des Enterotoxins C in der späten exponentiellen Wachstumsphase durch *agr* reguliert wird, und damit möglicherweise so das Vordringen der Bakterien in tiefere Gewebeschichten ermöglicht wird [170].

Der *agr*-Locus von *S. (pseud)intermedius* besteht aus zwei divergenten Transkriptionseinheiten (RNAII und RNAIII), die durch die Promotoren P2 bzw. P3 gesteuert werden. Das P2-Operon enthält vier Gene: *agrA*, *agrB*, *agrC* und *agrD*. Das P3

Operon enthält ein Gen (RNAIII), das für ein Delta-Hämolyisin kodiert und als Effektor der *agr*-Response zur Aktivierung von extrazellulären Proteinen führt [170].

Da sich der *agr*-Locus in Staphylokokken durch eine hohe genetische Variabilität auszeichnet, hat er sich der Nachweis spezifischer Polymorphismen in den vier Genen des Operons P2 in vielen Studien als Instrument zur Untersuchung der Spezies-Diversität und Typisierung von Staphylokokken etabliert [171]. Insbesondere *agrD*, das für das Vorläufer-Peptid des spezifischen AIPs kodiert, zeigt meist hohe speziesspezifische Unterschiede und kann durch seinen hypervariablen Bereich zur Typisierung herangezogen werden [118, 170]. *AgrB* kodiert für ein Membran-durchspannendes Protein, das für die Modifizierung des Vorläuferpeptids zum fertigen AIP und für seine Sekretion in die Umgebung verantwortlich ist und zeigt ebenfalls hohe Sequenzvariabilität. Der zum AIP passende membran-gebundene Rezeptor aus der Familie der Histidin-Protein-Kinasen wird durch *agrC* kodiert und seine spezifische Divergenz im N-Terminus korrespondiert mit dem jeweiligen polymorphen AIP. Dies bedeutet, dass Mutationen in *agrD* durch Koevolution zu gleichzeitigen Veränderungen des Rezeptormoleküls *agrC* führen. *AgrA* kodiert für einen Response-Regulator, der an der eigentlichen, speziesspezifischen Rezeptor-Liganden-Interaktion der AIPs nicht beteiligt ist, sondern die Transkription von P2 und P3 reguliert. Daher sind hier nur geringe Sequenz-Variationen bei den verschiedenen Staphylokokken-Spezies festzustellen [170]. In *S. aureus* definieren Polymorphismen in *agrD* und *agrC* vier verschiedene *agr*-Gruppen. Für *S. pseudintermedius* sind bislang vier Allel-Varianten von *agrD* beschrieben [118].

Das eigentliche AIP wird im Cytoplasma der Staphylokokken aus dem von *agrD* produzierten Peptid-Vorläufer gebildet und an die extrazelluläre Umgebung abgegeben [172]. Nach Bindung an den spezifischen Membran-gebundenen Rezeptor erfolgt eine Phosphorylierung und damit Aktivierung des Response-Regulator Proteins und die Expression des entsprechenden Virulenzassoziierten Zielgens wird an- bzw. ausgeschaltet. Heterologe AIPs anderer *agr* Gruppen (z.B. von anderen Stämmen oder anderen Staphylokokken Spezies) führen zu einer kompetitiven Inhibition der Signal-Transduktion, so dass damit möglicherweise bereits kolonisierte Stämme die gleichzeitige Invasion weiterer Keime durch Inhibition ihres Regulatorsystems unterbinden können [173].

Die modifizierten AIP-Moleküle bestehen aus sieben bis neun Aminosäuren und sind bei Staphylokokken durch eine charakteristische Seitenkettenmodifikation in Form eines Thiolakton-Rings gekennzeichnet [168]. Für die Staphylokokken der SIG gibt es allerdings Besonderheiten: Bei allen drei Spezies der SIG kommen die gleichen vier AIP-Varianten vor, das heißt innerhalb der SIG gibt es keine Spezies-spezifischen AIPs, die sonst, so weit bekannt, für jede Staphylokokkenspezies charakteristisch sind. Dies könnte bedeuten, dass die Staphylokokken der SIG zu einem gemeinsamen Quorum-sensing fähig sind [118]. Eine weitere große Besonderheit der SIG besteht darin, dass sie die einzigen Staphylokokken sind, die als Seitenketten-modifikation des AIP keinen Thiolakton-Ring, sondern einen Lakton-Ring besitzen [174]. Der Thiolaktonring besteht bei allen anderen Staphylokokken aus fünf Aminosäuren, wobei ein konserviertes Cystein über eine Thioester-Bindung an den C-Terminus gebunden ist. Dieses zyklische (Thio-) Lakton ist für die Aktivierung bzw.

Inhibierung von *agrC* notwendig. Bei den Staphylokokken der SIG ist Cystein durch die Aminosäure Serin ersetzt, was dazu führt, dass kein Thiolakton, sondern ein Laktonring entsteht. Die Ursache dieser evolutionären Besonderheit der SIG ist unklar und es wird vermutet, dass eine Punktmutation in *agrD*, die zum Austausch von Cystein durch Serin führte, eine Anpassung der anderen *agr*-Gene des Operons, insbesondere von *agrC*, nach sich zog und dies letztlich zur phylogenetischen Divergenz von *S. (pseud)intermedius* und *S. aureus* führte [174]. Es wird vermutet, dass die *agr* Differenzierung ein sehr frühes und elementares evolutionäres Ereignis war und eine biologische Signifikanz dadurch entsteht, dass teilweise bestimmte *agr*-Gruppen mit spezifischen Biotypen korrelieren [175]. Bei *S. aureus* sind z.B. bestimmte TSST und PVL produzierende Stämme mit der *agr*-Gruppe III assoziiert [176], während Exfoliatin-produzierende Stämme meist zur *agr* Gruppe IV gehören [177].

## 2.2.4 Resistenzmechanismen gegenüber $\beta$ -Lactam-Antibiotika

### 2.2.4.1 $\beta$ -Lactamase Expression

$\beta$ -Lactame, wie das Penicillin, das seit 1941 therapeutisch im Einsatz ist, werden aufgrund ihrer bakteriziden Wirkung gegenüber proliferativen Keimen und besonders zur Therapie eitriger Staphylokokken-Infektionen eingesetzt.  $\beta$ -Lactame inhibieren die bakterielle Zellwandsynthese, indem sie an zellmembranassoziierte Penicillin-bindende Proteine (PBP) binden, welche die Quervernetzung des Peptidoglykans der Zellwand katalysieren. Die  $\beta$ -Lactame binden dabei kovalent an das aktive Zentrum der PBP und verhindern damit deren essentielle Transpeptidase-Funktion. Schließlich hält die wachsende Zellwand den osmotischen Druckdifferenzen nicht mehr stand, was letztlich die bakterizide Wirkung dieser Wirkstoffklasse gegenüber wachsenden Keimen bedingt [178].

Ein möglicher Mechanismus der letalen Wirkung der  $\beta$ -Lactame zu entgehen ist die Produktion von  $\beta$ -Lactamasen, die durch die hydrolytische Spaltung des  $\beta$ -Lactamrings direkt zu einer Inaktivierung des Wirkstoffs führen. Die Expression von  $\beta$ -Lactamasen wie z.B. der Penicillinase (kodiert durch *blaZ*) in Staphylokokken ist oft durch die Präsenz von  $\beta$ -Lactamen induzierbar, oder kann durch sie enorm verstärkt werden. Einige Stämme exprimieren  $\beta$ -Lactamasen aber auch konstitutiv [179]. Abhängig von der DNA-Sequenz des kodierenden *blaZ* werden  $\beta$ -Lactamasen in verschiedene Klassen (A-D) eingeteilt (sog. Ambler-Classes) und abhängig vom Resistenz-Phänotyp sind Unterscheidungen in weitere Subgruppen möglich. Gut 80% der klinischen Staphylokokken-Isolate sind in der Lage Penicillinase zu bilden und somit klassische Penicilline ebenso wie Amino- oder Ureidopenicilline zu inaktivieren [180]. Die  $\beta$ -Lactamasen der Staphylokokken gehören dabei meist zur Klasse A [181]. Das  $\beta$ -Lactamase-Operon mit dem strukturellen *blaZ*-Gen und seinen Regulatorgenen (*blaI* und *blaR1*) liegt auf dem nicht-konjugativen Transposon Tn552, das häufig Bestandteil verschiedener Plasmide ist [182, 183], aber auch chromosomal in der Nähe der Insertionssequenzen IS1181 und IS257 ist das Operon in vielen Stämmen nachzuweisen [184].

Mit dem 1959 eingeführten Methicillin wurde ein halbsynthetisches Penicillin auf den Markt gebracht, das nicht durch die Penicillinase-bildende Staphylokokken abgebaut werden und damit auch bei bis dahin Penicillin-resistenten Staphylokokken eingesetzt werden konnte. Doch bereits wenige Jahre nach der Markteinführung des Methicillins wurden erstmals auch Methicillin-resistente Staphylokokken beschrieben [185], deren Resistenz auf einem alternativen Mechanismus basieren musste.

#### **2.2.4.2 Methicillin-Resistenz**

Die Methicillin-Resistenz wird durch die Produktion eines zusätzlichen zellwandvernetzenden Proteins vermittelt, dem 76-kDa großen Penicillin-bindenden Protein (PBP) 2a. Dieses hat eine 1000-fach geringere Affinität zu  $\beta$ -Lactamen als die übrigen Penicillin-bindenden Proteine und kann auch in Anwesenheit von  $\beta$ -Lactamen die Zellwandsynthese aufrechterhalten [186, 187]. Methicillin-resistente Bakterien sind dabei sowohl resistent gegenüber allen  $\beta$ -Lactamantibiotika als auch gegenüber den anderen Penicillinase-festen Wirkstoffen, wie Cephalosporinen und Carbapenemen. Die phänotypische Expression der Methicillin-Resistenz ist allerdings abhängig von verschiedenen genetischen und umweltbedingten Faktoren, wie z.B. der Osmolarität, der Temperatur, dem Nährmedium oder der Art des eingesetzten  $\beta$ -Lactams bzw. unabhängigen Stoffwechselfaktoren, und zeichnet sich daher durch große Variabilität aus [188]. Schon die Nachkommen eines einzigen Isolats können unter Standard-Wachstumsbedingungen in der Bouillon-Kultur bezüglich der Ausprägung ihres Resistenzphänotypen gegenüber Methicillin erhebliche Unterschiede zeigen [186, 189]. Einige Studien unterscheiden daher homogene Expressionsphänotypen (nahezu alle Zellen einer Population zeigen eine minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) gegenüber Methicillin von mehr als 50  $\mu\text{g/ml}$ ) von heterogenen Expressionsphänotypen (ein großer Teil der Zellen zeigt eine Methicillin MHK im sensiblen Bereich) [180]. Diese Tatsache spielt vor allem in der mikrobiologischen Diagnostik eine große Rolle, in der die Methicillin-Resistenz oftmals nur phänotypisch getestet wird, und somit im Falle von heterogenen Expressionsphänotypen unter Umständen zu falschen Befunden führen kann. Zudem werden häufig weitere Resistenzen z.B. gegenüber Aminoglykosiden, Makroliden und Fluorchinolonen in Zusammenhang mit der Methicillin-Resistenz beobachtet [190].

PBP2a, das für die Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, wird kodiert durch das *mecA*-Gen, das wiederum Teil eines mobilen genetischen Elements, des Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (*SCCmec*), ist [186]. *SCCmec* ist je nach Zusammensetzung ca. 21 bis 68 kbp groß und wird direkt in das Staphylokokkengenom, in der Nähe des Replikationsursprungs integriert [191, 192]. Es enthält neben *mecA* und seinen Regulatorgenen (dem Repressor *mecI* und dem Responseregulator *mecR1*) auch verschiedene Varianten von Rekombinasegenen (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*), die für Serin-Rekombinasen vom Typ Resolvase/Invertase kodieren und den Ein- und Ausbau in das Bakteriengenom ermöglichen. Der Aufbau der Regulatorgene von *mecA* zeigt einen hohen Grad an Homologie zu dem Regulatorkomplex von *blaZ* (*blaI* und *blaR1*) [193, 194], und Studien konnten zeigen, dass

dieser sogar in der Lage ist, die Expression von *mecA* zu regulieren [195, 196]. Zusätzlich finden sich eine Reihe von integrierten Plasmiden und Transposons in *SCCmec*, wie z.B. Tn554, Tn4001, pT181 oder puB110, die oft weitere Resistenzgene beherbergen [197]. Die unterschiedliche Zusammensetzung von Regulatorgenen, Rekombinasevarianten und zusätzlichen Genen charakterisiert verschiedene Typen von *SCCmec*, von denen bisher sieben beschrieben sind, teils mit einer Vielzahl von Subtypen [198-204].

Die Methicillin-Resistenz wird in Staphylokokken entweder phänotypisch (Nachweis der Expression von PBP2a) oder genotypisch (Nachweis des *mecA*-Gens) definiert [188, 205].

Methicillin-resistente *S. (pseud)intermedius* wurden erstmals 1996 in einer spanischen Studie beschrieben, in der die *in vitro* Aktivität 15 verschiedener Antiinfektiva gegenüber 91 *S. (pseud)intermedius* Isolaten untersucht wurde [206]. Eine weitere Studie aus dem Jahr 1999 [207] wies dann auch genotypisch das Methicillin-Resistenz kodierende Gen *mecA* in *S. (pseud)intermedius* nach und stellte zudem einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von *mecA* und zusätzlichen Resistenzen gegenüber weiteren Antiinfektivaklassen, also einer ausgeprägten Multiresistenz dar. Lilenbaum et al. isolierten 1998 und 1999 MRS(P)I aus Proben der Haut bzw. der Maulhöhle klinisch gesunder Katzen und ermittelten für beide Isolationsorte hohe Prävalenzen [129, 208].

### 2.2.5 Molekulare Typisierungsverfahren für *S. pseudintermedius*

Die Typisierung von Infektionserregern ist von großem epidemiologischem Interesse und dient unter anderem auch als sinnvolle Unterstützung von Infektionskontroll-Maßnahmen. Im Zuge steigender Resistenzraten hat die Aufklärung der Epidemiologie von z.B. Methicillin-resistenten Staphylokokken vermehrt an Bedeutung gewonnen, da jede Strategie zur Eindämmung von MRS auf lokaler, nationaler sowie internationaler Ebene Erkenntnisse darüber erfordert, wie sich die Stämme ausbreiten und wie Epidemien entstehen. Die Untersuchung des genetischen Hintergrunds verschiedener Isolate erlaubt die Annäherung an Fragestellungen bezüglich der Herkunft und Verbreitung dieser Stämme und kann klären, ob epidemiologisch verwandte Isolate auch genetisch verwandt sind. Dies ist z.B. bei der Unterscheidung zwischen sporadischen Infektionen (z.B. durch Autoinfektionen aufgrund von nasaler Kolonisation, keine zeitliche oder räumliche Ausbreitung in einer Praxis/ Klinik) und regelrechten Ausbruchsgeschehen von großer Bedeutung. Zur Verfolgung der Ausbreitung bestimmter bakterieller Klone stellt die Typisierung somit ein unverzichtbares Werkzeug dar. Weiterhin sind Erkenntnisse über die generelle Anzahl der weltweit bedeutendsten zirkulierenden Klone von großer Wichtigkeit, ebenso wie Informationen über die Vorfahren neuartiger resistenter Klone und die genetische Verwandtschaft sensibler und resistenter Linien. Für MRSP, die erst seit wenigen Jahren vermehrt in veterinärmedizinischen klinischen Einrichtungen auftreten, sind Informationen zur Epidemiologie kaum verfügbar und deshalb gerade in Verbindung mit den zugehörigen klinischen Daten und den auf minimalen Hemmstoffkonzentrationen (MHK) basierten Resistenzprofilen von außerordentlicher Bedeutung.

Wichtige Anforderungen an Methoden zur Typisierung von Bakterien sind eine große diskriminatorische Eigenschaft, gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch zwischen verschiedenen Laboratorien ebenso wie ein verhältnismäßiger Kostenaufwand, der auch einen routinemäßigen Einsatz ermöglicht.

Verschiedene molekulare Typisierungsverfahren haben sich inzwischen für Methicillin-resistente Staphylokokken etabliert, die sich im Wesentlichen in ihrer jeweiligen diskriminatorischen Aussagekraft und ihrer Anwendbarkeit unterscheiden. Während vor allem für MRSA mehrere standardisierte Typisierungsverfahren etabliert sind, ist dies für MRSP vielfach noch nicht der Fall. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden sind meist an Typisierungsverfahren für MRSA angelehnt bzw. sind mit verschiedenen Modifikationen speziell an *S. pseudintermedius* adaptiert. Sie sollen an dieser Stelle daher kurz vorgestellt und ihre jeweiligen diskriminatorischen Eigenschaften sollen vergleichend erläutert werden.

#### **2.2.5.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)**

Die PFGE gilt vor allem bei der Untersuchung von lokalen, kurzfristigen Ausbruchsgeschehen z.B. bei nosokomialen Infektionen als der Goldstandard zur Typisierung von MRSA [209]. Das Verfahren beruht auf der Makrorestriktion des gesamten bakteriellen Genoms mithilfe von selten schneidenden Endonukleasen (z.B. SmaI, ApaI). Während der Elektrophorese im elektrischen Feld entsteht durch die größenabhängige Auftrennung der ca. 15-16 entstandenen DNS-Fragmente im speziellen halbfesten Agarose-Gel ein spezifisches Bandenmuster („genetischer Fingerabdruck“), das mittels Ethidiumbromid-Färbung im UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Da hier das gesamte Bakteriengenom zur Typisierung herangezogen wird, zeichnet sich diese Methode durch eine gute diskriminatorische Aussagekraft aus [210, 211]. Dies hat jedoch andererseits zur Folge, dass auch kleine rekombinatorische Ereignisse, wie die Aufnahme oder der Verlust von DNA in Form von Plasmiden, Transposons und einzelnen Genen oder Genkassetten, sich im Bandenmuster widerspiegeln können.

Lokale und zeitlich in engem Zusammenhang stehende Isolate, die ein identisches oder sehr ähnliches Bandenmuster aufweisen, können daher auf ein nosokomiales Ausbruchsgeschehen hinweisen. Die Ursache der Ausbreitung, wie z.B. kontaminiertes Equipment, unzureichende Händehygiene etc. kann so u.U. ermittelt werden. Innerhalb von kürzeren Zeitabständen geht man von einer relativ geringen genetischen Variation der Stämme aus, zum Langzeit-Vergleich oder zur Darstellung phylogenetischer Verwandtschaft ist die PFGE allerdings nicht besonders gut geeignet [211]. Für MRSA wurde im Jahr 2003 im Rahmen eines EU-geförderten Projektes ein von 12 europäischen Laboren entwickeltes und erprobtes Standardprotokoll veröffentlicht, das den Vergleich von Bandenmustern zwischen verschiedenen Laboren und damit auch ein internationales Nachverfolgen epidemischer Stämme (E-MRSA) ermöglichen sollte [209]. Auch die Anwendung standardisierter Analyse-Software unter Berücksichtigung festgelegter Kriterien ermöglicht Auswertungen, die zumindest für lokale Ausbruchsgeschehen validiert sind [212]. Dennoch hat sich gezeigt,

dass auch dieses Standard-Protokoll nicht für alle MRSA geeignet ist. MRSA vom Sequenztyp 398, der häufig beim Schwein zu finden ist und vermutlich auch auf den Menschen übertragen werden kann, lässt sich mit dem Enzym SmaI nicht typisieren [213, 214].

Für MRSP gibt es bisher kein standardisiertes PFGE-Protokoll. Verschiedene Studien haben mit den Restriktions-Endonukleasen SmaI und ApaI jeweils wenige Stämme typisiert, häufig aber auch begleitet von vereinzelt untypisierbaren Stämmen [48, 157].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 146 MRSP mithilfe der PFGE typisiert, wobei ein ursprünglich für Streptokokken entwickeltes Elektrophorese-Laufprogramm leicht modifiziert wurde [215]. Die Präparation der bakteriellen DNA erfolgte nach dem oben erwähnten Standard-Protokoll für MRSA.

#### **2.2.5.2 Multilocus Sequence Typing (MLST)**

Das Verfahren des Multilocus Sequence Typing (MLST), das zuerst als Modell für *Neisseria meningitidis* etabliert wurde [216], beruht auf der DNS-Sequenzanalyse von normalerweise sieben definierten *housekeeping*-Genen. Diese Gene, die in der Regel zum so genannten Core-Genom („Kerngenom“) des Bakteriums gehören, sollten nicht horizontal übertragen werden und keinen bzw. nur wenigen rekombinatorischen Ereignissen unterworfen sein [217]. Die MLST eignet sich daher besonders für globale Langzeit-Studien. Abhängig von der Bakterienspezies wird ein definierter Abschnitt der *housekeeping*-Gene mittels PCR amplifiziert und im Anschluss doppelsträngig DNS-sequenzanalysiert. Die resultierenden Sequenzen können dann für jedes Gen einem bestimmten Alleltypen zugeordnet werden, und die Kombination der verschiedenen Alleltypen ergibt letztlich den jeweiligen Sequenztypen (ST).

Für einige Bakterienspezies existieren Internet-Datenbanken (z.B. [www.mlst.net](http://www.mlst.net)), in denen die Sequenzdaten hinterlegt sind, die mit den zugehörigen klinischen Daten verbunden werden können. Somit ergibt sich eine nahezu globale Informationsquelle, die Verwandtschaftsanalysen auch über längere Zeiträume und große geographische Distanzen ermöglicht. Da die MLST im Gegensatz zur PFGE jedoch rekombinatorische Ereignisse im Gesamtgenom nicht gut erfassen kann und somit weniger diskriminativ ist, ist sie zur Analyse von lokalen Ausbruchsgeschehen ungeeignet [218].

Für *S. aureus* wurde 2000 von Enright et al. ein MLST-Schema etabliert, das definierte Fragmente der Stoffwechselgene *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* und *ypiL* für die Analyse berücksichtigt [217]. Die Auswahl dieser sieben *housekeeping*-Gene hat bei *S. aureus* zu einer Differenzierung von durchschnittlich 42 Allelvarianten pro Locus geführt, was in einer Auflösung von über 200 Milliarden Sequenztypen resultiert und die Möglichkeit vollkommen unverwandter Stämme im selben Sequenztyp sehr unwahrscheinlich macht [219]. Die Tatsache, dass für einige MSSA- und MRSA-Stämme bereits Sequenzierungen des gesamten Genoms durchgeführt und Genkarten angefertigt werden konnten, ist für die Validierung des etablierten MLST-Schemas von großer Bedeutung.

Für *S. pseudintermedius* ist bisher noch keine Sequenzierung des gesamten Genoms veröffentlicht. Bannoehr und Kollegen haben 2007 im Zuge der Untersuchungen zur Populationsdiversität innerhalb der SIG vier Abschnitte von *housekeeping* Genen (*pta*, *cpn60*, *tuf*, 16S rRNA) sowie den globalen Virulenzregulator *agrD* der drei SIG-Spezies DNS-sequenz analysiert. Diese wurden jüngst auch in weiteren Studien als vorläufiges MLST-Schema für MRSP verwendet, weshalb es auch im Rahmen dieser Arbeit Verwendung findet. Dies ermöglicht Vergleiche der Sequenzanalysen mit anderen europäischen und amerikanischen Daten, die für MRSP bislang nur sehr begrenzt vorhanden sind.

### **2.2.5.3 Tandem Repeat Sequenz Analyse des Staphylococcal Protein A (*spa*-Typing)**

Das *spa*-Typing ist ein ursprünglich für *S. aureus* entwickeltes Typisierungsverfahren, das auf spezifischen Sequenzvariationen des kodierenden Gens beruht. Das für das staphylococcal Protein A kodierende *spa*-Gen ist bei *S. aureus* ca. 2150 bp groß und besteht aus funktionell unterschiedlichen Regionen: dem C-Terminus, der für die Zellwandanheftung benötigt wird, der Fc-bindenden Region, die sich aus fünf 160 bp Repeats zusammensetzt und der polymorphen X-Region, die bei *S. aureus* durch eine variable Anzahl von 24 bp Repeats charakterisiert ist [220]. 1994 wurde die *spa*-Typisierung von MRSA erstmalig beschrieben, ursprünglich mit dem Ziel epidemische von nicht epidemischen MRSA mit einem einfachen genetischen Marker unterscheiden zu können [221]. Mittels DNA-Sequenzanalyse der X-Region wird ihre genaue Repeat-Zusammensetzung ermittelt und für Vergleiche herangezogen. Bei *S. aureus* überwiegen Punktmutationen deutlich in der Häufigkeit ihres Auftretens im Vergleich zu Rekombinationen [222]. Da die Repeat-Region von *spa* sowohl spontanen Punktmutationen als auch dem Verlust oder der Aufnahme neuer Repeats unterliegt [223], zeichnet sich diese Single-Locus DNS-Sequenzierung vor allem aufgrund ihrer großen diskriminatorischen Aussagekraft und des vergleichsweise geringen Kosten- und Zeitaufwands aus. Seit im Jahr 2003 eine Analyse Software mit angebundener Internet-Datenbank das Erkennen und Zuordnen der einzelnen Repeats zu bestimmten *spa*-Typen vereinfacht und standardisiert hat ([www.ridom.de/spaserver](http://www.ridom.de/spaserver)), ist das *spa*-Typing zum häufig angewendeten Standard-Verfahren für die Typisierung von MRSA geworden [223]. Mittlerweile sind in der Datenbank für *S. aureus* 406 verschiedene Repeats und über 7.031 *spa*-Typen aus 75 Ländern bekannt (ridom, Stand August 2010). Zwar hat sich einerseits eine gute Korrelation zwischen MLST-ermittelten klonalen Gruppen und zugehörigen *spa*-Typen gezeigt [224, 225], aber andererseits gibt es auch einen gewissen Grad an *spa*-Repeat Variation innerhalb eines Sequenztyps, somit kann das *spa*-Typing ein verfeinerteres Typisierungswerkzeug als die MLST sein [223, 226]. In einer jüngst veröffentlichten Studie konnten mithilfe des *spa*-Typings mehrere nosokomiale MRSA-Ausbrüche in einer Pferdeklinik aufgedeckt werden. Hierbei sind identische *spa*-Typen bei MRSA-Isolaten von Pferden, Personal, veterinärmedizinischen Studenten sowie in Räumen und der Umgebung aufgetreten [227].

In *S. pseudintermedius* wurde erst im Jahr 2009 ein putatives *spa*-Gen identifiziert und ein entsprechendes Typisierungsschema publiziert [157]. Im Gegensatz zu *S. aureus* besitzt das staphylococcal Protein A in *S. pseudintermedius* nur drei IgG bindende Domänen. Im *S. pseudintermedius* Stamm ED99, dessen *spa*-Sequenz als Referenz in der NCBI GenBank hinterlegt ist ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), ist das kodierende *spa*-Gen insgesamt 1389bp groß und es zeigt sich eine 68%ige Nucleotid- und 55%ige Aminosäure-Übereinstimmung mit dem homologen Gen bzw. Protein im *S. aureus* Referenzstamm 82325-4, in dem *spa* zuerst beschrieben wurde [157]. Die polymorphe X-Region setzt sich bei *S. pseudintermedius* aus einer variablen Anzahl von 30bp repeats zusammen, von denen bisher 21 verschiedene beschrieben sind: Zwischen zwei- und zehnmal können die Repeats vorhanden sein und so den jeweiligen *spa*-Typen charakterisieren. Bisher sind 25 *spa*-Typen für *S. pseudintermedius* beschrieben, allerdings gibt es bislang nur wenige Publikationen, die das *spa*-Typing bei klinischen MRSP beschreiben [157, 228]. Für das *spa*-Typing von *S. pseudintermedius* existiert daher bislang noch keine Analyse-Software oder Internet-Datenbank.

Alle in dieser Arbeit untersuchten MRSP wurden dem *spa*-Typing unterzogen. Basierend auf der bei NCBI GenBank hinterlegten *spa*-Sequenz von *S. pseudintermedius* ED99 wurden neue Primer für die X-Region entworfen, die Sequenzen wurden dann mithilfe der BioNumerics Software (Version 4.6, Applied Maths; Gent, Belgien) nach dem von Moodley et al. entwickelten Repeat-Schema ausgewertet [157].

#### **2.2.5.4 Typisierung des mobilen genetischen Elements Staphylococcal Chromosome *mec* (SCC*mec*)**

Der strukturelle Aufbau des mobilen genetischen Elements SCC*mec*, das charakteristisch für Methicillin-resistente Staphylokokken ist, wird ebenfalls zur Typisierung herangezogen. SCC*mec* besteht aus verschiedenen Abschnitten, deren Zusammensetzung variiert und die Unterscheidung verschiedener Typen erlaubt [197]. Das die Methicillin-Resistenz kodierende Gen *mecA* bildet mit seinen Regulatorgenen und den Insertionssequenzen IS431 sowie  $\Psi$ IS1272 den zentralen Bestandteil von SCC*mec*, den so genannten *mec*-Komplex. Der *mec*-Komplex unterliegt in seinem Aufbau einer Variabilität, das heißt *mecI* und *mecR1* können teilweise unvollständig sein, oder ganz fehlen bzw. sie sind durch die Insertionssequenzen IS431 oder IS1272 ersetzt. Dies erlaubt eine Unterteilung in fünf verschiedene Komplex-Typen (A bis E), der Komplex-Typ C wird noch weiter unterteilt in C1 und C2 [197, 229]. Auch die für den Ein- und Ausbau in das Bakterienchromosom benötigten Rekombinasegene, die den Rekombinase (*ccr*)-Komplex bilden, können in unterschiedlichen Kompositionen auftreten (*ccrAB1* bis *ccrAB5*, *ccrC*) [230]. Die Zusammensetzung von *mec*-Komplex und zugehörigem Rekombinase-Komplex bestimmt den jeweiligen SCC*mec*-Typ, von dem bisher sieben (SCC*mec*I – SCC*mec*VII) beschrieben sind [197, 198, 201, 204, 231]. Eine weitere Region, die J-Region („Junkyard“-Region) wird unter anderem zur Charakterisierung von Subtypen herangezogen, SCC*mec*IV lässt sich somit z.B. noch in vier Varianten unterteilen [231]. Die J-Region unterteilt sich in drei Abschnitte (J1: zwischen *ccr*-

Komplex und rechter flankierender chromosomalen-Region; J2: zwischen *mec*- und *ccr*-Komplex; J3: zwischen *mec*-Komplex und *orfX*) und enthält z.B. integrierte Kopien Resistenz-kodierender Plasmide oder Transposons wie pUB110 (Kanamycin-Resistenz), pT181 (Tetrazyklin-Resistenz), Tn554 (Macrolid-Lincosamid-Streptogramin B Resistenz),  $\Psi$ Tn554, Tn4001 (Gentamycin-Resistenz) [197, 229].

Bei *S. pseudintermedius* wurden außerdem auch kombinierte Varianten identifiziert, z.B. von SCC*mec*II und SCC*mec*III, sowie verschiedene weitere Varianten wie SCC*mec* VII-241, SCC*mec*V<sub>T</sub> und auch untypisierbare SCC*mec*-Elemente sind beschrieben [201, 203, 228]. SCC*mec* selbst ist zwar in der Lage weiteres genetisches Material aufzunehmen oder abzugeben, der *mec*-Komplex unterliegt jedoch keinen weiteren Deletionen oder Mutationen [232]. Um im Speziellen die Herkunft von *mecA* in Methicillin-resistenten Staphylokokken zu beleuchten, eignet sich das SCC*mec*-Typing daher gut. In Kombination mit weiteren molekularbiologischen Methoden, wie z.B. der MLST, kann das SCC*mec*-Typing wichtige Einblicke in den Ursprung der Methicillin-Resistenz geben [233]. Die *International Union of Microbiological Societies* hat daher eine Kombination aus Sequenztyp, SCC*mec*-Typ und Phänotyp als internationale Nomenklatur für MRSA akzeptiert [234]. Verschiedene Multiplex-PCR-Ansätze sind für ein schnelles und effizientes SCC*mec*-Typing von MRSA entworfen worden [229, 235, 236]. Sie berücksichtigen meist einzelne, charakteristische Elemente der *mec*- und *ccr*-Komplexe, oder der J-Regionen. Da diese Multiplex-Ansätze oftmals nur einzelne Rekombinasegene anstelle des gesamten *ccr*-oder *mec*- Komplex nachweisen, können sie mitunter nicht alle Varianten bzw. zusammengesetzte Elemente nachweisen. Da zudem im Laufe der letzten fünf Jahre häufig neue Varianten von SCC*mec* beschrieben wurden [198], hat sich die Zahl der Allele, die zum eindeutigen Typisieren nötig sind, und damit auch die Zahl der Primerpaare für PCR-Ansätze immer wieder erhöht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das SCC*mec*-Element aller untersuchten MRSP mithilfe einer breiten Kollektion an Primerpaaren untersucht, die alle Bestandteile der *mec*-und *ccr*-Komplexe, sowie eine Auswahl an charakteristischen Determinanten der J-Regionen detektieren. Dies ermöglicht auch den Nachweis von mosaikartig zusammengesetzten oder neuartig strukturierten SCC*mec*-Elementen.

## 3 Publikationen

### 3.1 Publikation 1

**Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae**

**Prävalenz Methicillin-resistenter *Staphylococcus pseudintermedius*, isoliert aus klinischen Proben von Kleintieren und Equiden**

Publiziert in Veterinary Microbiology, 14.04.2009; Ausgabe 136 (1-2): Seiten 197-201

DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.10.023

Eingegereicht: 12. August 2008

Akzeptiert: 24. Oktober 2008

#### 3.1.1 Zusammenfassung (Übersetzung der Originalpublikation)

In dieser Studie wurde die Prävalenz von Methicillin-resistenten *Staphylococcus pseudintermedius* in klinischem Probenmaterial verschiedener Tierarten bestimmt, indem insgesamt 16.103 veterinärmedizinische klinische Proben aus fünf deutschen Bundesländern im Jahr 2007 untersucht wurden. Von allen untersuchten Proben zeigten sich 72 positiv für MRSP, was einer Gesamtprävalenz von 0.45% entspricht. In klinischen Proben von Kleintieren beträgt die Prävalenz 0.58 % ( $n = 67$ ; Hunde  $n = 61$ ; Katzen  $n = 6$ ), während Proben von Equiden eine Prävalenz von 0.10 % ergeben ( $n = 5$ ; Pferde  $n = 4$ ; Esel  $n = 1$ ). Sechsvierzig repräsentativ ausgewählte, phänotypisch identifizierte MRSP wurden mithilfe von DNA-basiertem Speziesnachweis, PCR-vermitteltem Nachweis von *mecA* sowie SCC*mec*-Typisierung und MHK-Bestimmung weiter differenziert. Durch Sequenzanalyse der housekeeping-Gene *pta* und *cpn60* sowie positive PCR-Ergebnisse für *mecA*, erwiesen sich alle 46 Isolate eindeutig als MRSP. Weiterhin enthalten alle Isolate SCC*mec* TypIII. Die Resistenztestung der Isolate mittels 20 verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen offenbart einen hohen Anteil multiresistenter Isolate (45 von 46), die ein identisches oder zumindest ähnliches Resistenzmuster gegenüber nicht- $\beta$ -Lactam basierenden antimikrobiellen Wirkstoffen zeigen. Die festgestellte Prävalenz von MRSP, die bereits als potentielle zoonotische Erreger beschrieben wurden, spiegelt das seit Kurzem verstärkte Auftreten dieser ersten und oft multiresistenten Pathogene in Deutschland wider.

#### 3.1.2 Publikation

Short communication

## Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae

Claudia Ruscher<sup>a</sup>, Antina Lübke-Becker<sup>a</sup>, Claus-G. Wleklinski<sup>b</sup>, Alexandra Soba<sup>b</sup>, Lothar H. Wieler<sup>a</sup>, Birgit Walther<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Microbiology and Epizootics (IMT), Veterinary Faculty, Free University  
Berlin, Philippstraße 13, 10115 Berlin, Germany

<sup>b</sup> Synlab-vet, Labor Augsburg, Leitershofer Straße 25, 86157 Augsburg, Germany

### ABSTRACT

In this study the prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) in clinical specimens of different animal species was defined by investigating a total of 16,103 clinical samples originating from veterinary facilities of five German federal states in 2007. Of all samples examined, 72 were positive for MRSP, giving an overall prevalence of 0.45%. In clinical specimens originating from small animals the prevalence was 0.58% (n = 67; dogs n = 61 and cats n = 6), while samples from equidae revealed a prevalence of 0.10% (n = 5; horses n = 4, donkey n = 1). Forty-six representative phenotypically identified MRSP were further differentiated by DNA-based species assignment, PCR detection of *mecA*, SCC*mec*-typing and MIC determination. As expected, all 46 isolates were unambiguously proven to be MRSP by sequencing of housekeeping genes *pta* and *cpn60* and being positive for *mecA*. Furthermore, all isolates harboured the mobile staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) SCC*mec*III. Antibiotic susceptibility testing for 20 different conventional antimicrobial agents disclosed a high rate of multidrug-resistant isolates (45 of 46) displaying an identical or at least similar resistance pattern for non- $\beta$ -lactam antimicrobials. The recognized prevalence of MRSP, which have already been shown to be potential zoonotic agents, reflects the recently emerging development of these serious and often multidrug-resistant pathogens in Germany.

## 1. Introduction

Coagulase-positive staphylococci (CPS), especially members of the *Staphylococcus intermedius*-group (*S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*) are opportunistic pathogens in various animal species, particularly in dogs and cats (Biberstein et al., 1984; Cox et al., 1988). Conventional microbiological diagnostic tests often fail to distinguish between *S. pseudintermedius* and *S. intermedius*, leading to the assumption, that *S. pseudintermedius* were frequently misidentified as *S. intermedius* or *S. aureus* (Sasaki et al., 2007b; Van Hoovels et al., 2006). Recently, *S. pseudintermedius* was found to act as an important pathogen of skin and soft tissue infections in pet animals, especially as a major cause of canine pyoderma (Bannoehr et al., 2007). Being known only as a distinct species since 2005 (Devriese et al., 2005), many studies concerning methicillin-resistance in CPS did not include the species *S. pseudintermedius* (Griffeth et al., 2008; Morris et al., 2006). Consequently, knowledge concerning the prevalence, particularly of SCC*mec*-types of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) is scarce. Since 2002, we routinely screen CPS isolated from clinical samples for *mecA* by PCR. In 2006, a sudden rise in isolation of Methicillin-resistant SIG (MRSIG) from clinical specimens of animal origin was recognized.

Due to limited data available on the occurrence, prevalence and antimicrobial resistance pattern of MRSP, in 2007 we conducted a prevalence study, including genotypic species verification, SCC*mec*-typing and MIC determination. To increase the epidemiological validity, we collaborated with a larger diagnostic laboratory, thereby enlarging the sample size.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling

A total of 16,103 clinical specimens derived from diseased animal patients in different veterinary hospitals and smaller facilities were investigated during 2007. All specimens were sent in for microbiological diagnostic testing to the diagnostic section of the Institute of Microbiology and Epizootics (IMT Berlin) and Synlab-vet (Labor Augsburg).

### 2.2. Bacterial isolation and MRS confirmation

#### 2.2.1. Bacterial isolation

All diagnostic specimens were routinely streaked onto the following media: Standard nutrient agar I (Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) charged with 5% defibrinated sheep blood, Chrom agar orientation (Mast Diagnostica, Reinfeld, Germany) and Gassner agar (Sifin, Berlin, Germany). Hemolysis and growth characteristics were evaluated after aerobic incubation at 37 °C, first after 18 h and a second time after 36 h. Presumptive SIG were identified based on colony morphology, hemolysis, Gram stain appearance, catalase test, tube coagulase reaction and the ability to produce acid from different carbohydrates according to Bannermann and Peacock (1999) or by employing the automated BD Phoenix System (Becton Dickinson, Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) in accordance with manufacturer's instructions. Phenotypic testing for differentiation between isolates within the *S. intermedius*-group was completed by detection of ADH (Arginine Dihydrolase, DIATABS, Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark) and DNase (DNase-agar, Oxoid, Wesel, Germany) activity. Screening for Methicillin-resistance in isolates belonging to the SIG was initially performed by the

disk diffusion method using Oxacillin (5 µg) and Cefoxitin (30µg) as recommended by the CLSI, 2004 on Mueller-Hinton agar plates (Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). Samples were incubated at 35 °C for 24 h. For Oxacillin, breakpoints were those recommended for bacterial isolates from animals (CLSI, 2004) and for Cefoxitin, we used breakpoints as recommended for human CPS isolates (CLSI, 2005).

### 2.2.2. *MRS confirmation*

Verification of Methicillin-resistance in SIG and distinct exclusion of *S. aureus* was performed by PCR according to Merlino et al. (2002).

### 2.2.3. *S. pseudintermedius species verification*

DNA-sequence analysis of internal fragments of two conserved housekeeping genes (*cpn60*, *pta*) was used for species verification (Bannoehr et al., 2007). Analysis was carried out on a representative selection of 46 *S. pseudintermedius* isolates, including all isolates of cats (n = 6), horses (n = 4), the donkey and further 35 randomly chosen isolates from dogs. PCR-products were purified and DNA-sequence analyzed by Agowa-Sequence-Service (Agowa, Berlin, Germany). Alignment of the sequences was performed with deposited *pta* and *cpn60* sequences of *S. pseudintermedius* N940276 and HH4 (GenBank accession numbers EU157608 and EU157503), *S. intermedius* NCTC 11048 (GenBank accession number EU157414) and *S. delphini* ATCC 49171 (GenBank accession number EU157507) at NCBI GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### 2.3. *SCCmec-typing*

Primer sets and PCR-conditions for *SCCmec*-typing were used as described previously (Boyle-Vavra et al., 2005; Hanssen et al., 2004; Ito et al., 2004). Detection of pT181 was conducted according to Ito et al. (2001). As reference strains for PCR-determination of *ccr*- and *mec*-elements, NCTC 10442, N315, WIS, 85/2082 and CECT 231 were used.

### 2.4. *Antimicrobial susceptibility testing*

The microdilution method with automated BD Phoenix was used for MIC determination of 20 antimicrobial agents according to CLSI guidelines and clinical breakpoints standard M100-S15, M31-S1 (Clinical And Laboratory Standards Institute, 2004) for the representative 46 MRSP isolates. The tested panel is listed in Table 3.

### 2.5. *Statistical analysis*

Significance was tested with Chi-square test ( $\chi^2$ ) and by difference in proportion of two independent samples for the MRSP distribution among body sites of infection as well as for the distribution of MRSP in samples from different animal species.

### 3. Results

#### 3.1. Prevalence

Altogether 16,103 clinical specimens were examined in two diagnostic veterinary laboratories in 2007 for the occurrence of MRSP. Of these, a total of 870 isolates belonging to the SIG were identified (see Table 2) and the percentage of SIG within all coagulase-positive staphylo-cocci amounted to 76.2%. The overall prevalence of MRSP within all clinical specimens sent in for diagnostic purposes from dogs, cats and equidae was 0.45% ( $n = 72$ ). Within all CPS, MRSP represented 6.3% and MRSA 2.5% (for more detailed data see Table 2). The prevalence of MRSP in specimens from small animal origin amounted to 0.58%, i.e. in dogs 0.8% (61 out of 7490) and 0.1% in cats (6 out of 3903). A total of five MRSP were isolated from specimens of equid origin (horses  $n = 4$ ; donkey  $n = 1$ ), thus the prevalence of MRSP in specimens obtained from horses and donkeys was 0.1% (5 out of 4710). Comparing prevalence rates among the different animal species, MRSP prevalence in specimens from dogs was significantly higher than in cats and equidae ( $p < 0.001$ ). Regarding specimens from all animal species investigated, most MRSP (40.3%;  $n = 29$ ) were isolated from wound infections followed by specimens from the auditory channel (33.3%;  $n = 24$ ). Specimens from skin and mucosa and the urinary tract amounted to 8.3% ( $n = 6$ ). Additional details regarding the distribution of isolated, each MRSP among single animal species and body sites of specimen origin are given in Table 1.

**Table 1**  
Distribution of animal species and body site of infection of 72 isolated MRSP.

Animal species	Body site of infection																
	<i>n</i>	Wounds (%)	Urogenital tract (%)	Auditory channel (%)	Skin and mucosa (%)	Gastrointestinal tract (%)	Eye and conjunctiva (%)	Systemic infection (%)	Other sites <sup>a</sup> (%)								
All species	72	29	40.3	6	8.3	24	33.3	6	8.3	2	2.8	1	1.4	3	4.2	1	1.4
Dog	61	24	39.3	3	4.9	23	37.7	6	9.9	0	0	1	1.6	3	4.9	1	1.6
Cat	6	2	33.3	3	50	1	16.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Horse	4	3	75	0	0	0	0	0	0	1	25	0	0	0	0	0	0
Donkey	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0

Abbreviations: *n*, number.

<sup>a</sup> Joint aspirate.

**Table 2**  
Distribution of coagulase-positive staphylococci among isolates of small animals and equidae in 2007.

Animal species	<i>n</i>	Coagulase-positive staphylococci (CPS) <sup>a</sup>											
		SIG <sup>b</sup>	(%)	<i>S. aureus</i>	(%)	MRSP	(%)	MSSIG <sup>c</sup>	(%)	MRSA	(%)	MSSA	(%)
Total	1141	870	76.2	271	23.8	72	6.3	798	70.0	29	2.5	242	21.2
Dog	901	821	91.1	80	8.9	61	6.8	760	84.3	15	1.7	65	7.2
Cat	91	26	28.6	65	71.4	6	6.6	20	22.0	11	12.1	54	59.3
Horse	148	22	14.9	126	85.1	4	2.7	18	12.2	3	2.0	123	83.1
Donkey	1	1	100	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0

Abbreviations: *n*, number; MRSP, Methicillin-resistant *S. pseudintermedius*; MSSIG, Methicillin-susceptible SIGs; MRSA, Methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA, Methicillin-susceptible *S. aureus*.

<sup>a</sup> Except *S. hyicus*.

<sup>b</sup> Staphylococci of the *intermedius*-group: *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*.

<sup>c</sup> Other *mecA*-negative SIGs, species not closer identified.

### 3.2. Species verification and SCCmec-typing

Out of 72 MRSP identified, 46 representative MRSP isolates were further characterized by molecular typing. Genes *pta* and *cpn60* of all strains were a 100% identical to the deposited sequences of the *S. pseudintermedius* strains N940276 and HH4, respectively. DNA-sequence similarity with *S. intermedius* strain NCTC11048 and *S. delphini* ATCC 49171 for *pta* and *cpn60* varied between 92% and 97%. Furthermore, all 46 MRSP harboured SCCmecIII, by distinct detection of *ccrA3*, *ccrB3*, *mecl*, *mecRA*, *mecRB* and pT181.

### 3.3. Antimicrobial susceptibility testing

Out of 46 representative isolates, 45 (97.8%) showed multiple resistances in non- $\beta$ -lactam antimicrobials including erythromycin, clindamycin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, levofloxacin, and trimethoprim/sulfamethoxazol. While MIC results for some ( $\beta$ -lactam antimicrobials showed variable results, all 46 MRSP showed unambiguous resistance to Oxacillin (Table 3).

Table 3  
Results of MIC-determination of 20 antimicrobial agents for 46 MRSP.

Antimicrobial agent <sup>a</sup>	MIC range, $\mu\text{g/ml}$	Resistant	(%)	Intermediate	(%)	Susceptible	(%)
<b>Non-<math>\beta</math>-lactam antimicrobials</b>							
Clindamycin	$\leq 0.5$ to $>2$	45	97.8	0	0	1	2.2
Ciprofloxacin	1 to $>2$	45	97.8	0	0	1	2.2
Erythromycin	$\leq 0.25$ to $>4$	45	97.8	0	0	1	2.2
Fosfomycin	$\leq 16$ to 64	0	0	45	97.8	1	2.2
Fusidic acid	$\leq 4$	0	0	0	0	46	100
Gentamicin	$>8$	46	100	0	0	0	0
Levofloxacin	$\leq 1$ to $>4$	45	97.8	0	0	1	2.2
Linezolid	$\leq 1$ to 4	0	0	0	0	46	100
Moxifloxacin	$\leq 1$ to $>4$	45	97.8	0	0	1	2.2
Rifampin	$\leq 0.5$	0	0	0	0	46	100
Teicoplanin	$\leq 1$	0	0	0	0	46	100
Tetracyclin	$\leq 0.5$ to $>8$	28	60.9	3	6.5	15	32.6
Tobramycin	8 to $>8$	44	95.7	2	4.3	0	0
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	$>2/38$	46	100	NA	0	0	0
Vancomycin	$\leq 1$ to 4	0	0	0	0	46	100
<b><math>\beta</math>-lactam antimicrobials</b>							
Ampicillin/Sulbactam	$\leq 4/2$ to $>16/8$	37	80.4	0	0	9	19.6
Cefoxitin	$\leq 2$ to $>16$	12	26.1	0	0	34	73.9
Imipenem	$\leq 2$ to 8	0	0	1	2.2	45	97.8
Meropenem	$\leq 2$ to 8	13	28.3	2	4.3	31	67.4
Oxacillin	$>2$	46	100	0	0	0	0

Abbreviations: NA, no CLSI-approved breakpoint available.

<sup>a</sup> Breakpoints according to Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI), approved standard M100-S15, M31-S1.

## 3. Discussion

Although MRSP were earlier known to be an infective causative agent for animals (Bannoehr et al., 2007), only little is known about their particular importance in veterinary medicine in general. In this study, MRSP were identified in diagnostic material derived from clinically diseased dogs, cats, horses and one donkey. The reported rate of 6.3% MRSP within all CPS in contrast to 2.5% for MRSA substantiates the clinical relevance of MRSP for veterinarians as well as for veterinary microbiological laboratories. Nevertheless, we have to consider some limitations regarding prevalence rates due to the inability to discriminate infection from colonization or contamination in each case, which is inevitable to some degree. Similar to former results, no MRSI were found during this study, leading to the assumption that earlier studies concerning MRSI

should probably apply to MRSP (Hanselman et al., 2008; Sasaki et al., 2007b). In this study, the rate of MRSP isolated from specimens of wounds was significantly higher than those from all other infection sites ( $p < 0.001$ ). Thus, MRSP have turned out to be an important pathogen of wound infections in small animals, particularly in dogs, and are occasionally even associated with wound infections in horses.

The discriminating power of DNA-sequence analysis of internal fragments of *cpn60* and *pta* for differentiation of SIG has recently been shown (Bannoehr et al., 2007; Sasaki et al., 2007b). In this study, genotypic species verification by DNA-sequence analysis of these two highly conserved housekeeping genes showed 100% accordance with phenotypic typing results including DNase and argininedihydrolase-testing and allowed verification of 46 representative isolates as *S. pseudintermedius*. This finding has led us to recommend a combination of testing for enzymatic activity of argini-nedihydrolase and DNase as a useful diagnostic tool to differentiate staphylococci of the *intermedius*-group. Interestingly, SCC*mec*-typing results in this study only revealed one SCC*mec*-type, namely SCC*mec*III, among the 46 MRSP further investigated. While SCC*mec*V, several non-typeable SCC*mec*-types and new SCC*mec* have been reported in strains from the USA, Japan and Switzerland, SCC*mec*III seems to be more frequently associated with MRSP in Germany (Descloux et al., 2008; Moodley et al., 2009; Sasaki et al., 2007a). So far, the origin of SCC*mec* in MRSP is unknown, but horizontal gene transfer of SCC*mec* between different species of staphylococci has already been previously assumed (Hanssen et al., 2004). Animals colonized or infected with *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci (Vengust et al., 2006) or MRSA (Walther et al., 2008) could thereby serve as a potential source for SCC*mec* in SIG. Even transmission of SCC*mec* between MRSP and hitherto Methicillin-susceptible staphylococci, for example *S. aureus*, must be considered. Nevertheless, further information concerning acquisition and transmission routes of SCC*mec* is urgently needed. In our study, antimicrobial susceptibility testing revealed a remarkable multidrug resistance towards the majority of non- $\beta$ -lactam antimicrobials like fluorquinolones, aminoglycosides, and macrolides in 45 of 46 investigated MRSP, showing a similar resistance pattern for all 45 isolates. MIC results for different ( $\beta$ -lactam antimicrobials differ widely among the MRSP, except those for Oxacillin, which presented a resistant result for all strains investigated here. Especially for Cefoxitin MICs of MRSP, similar ambiguous results have been recently reported (Bemis et al., 2008). Therefore, we recommend an Oxacillin-based approach for phenotypical identification of MRSP. SIG are common components of the skin, oral and nasal flora of several mammalian species (Biberstein et al., 1984) and increasing prevalence of MRSP in companion animals and horses reported from different countries probably reflects a minatory development.

Up to now, human infections due to SIG were only reported sporadically (Campanile et al., 2007; Van Hoovels et al., 2006). Animal to human transmission of methicillin-resistant staphylococci or vice versa, as it has been assumed for MRSA (Weese et al., 2006), should be contemplated as a potential problem. In conclusion, further epidemiological studies concerning MRSP in veterinary settings and the community are needed, including detailed clinical data, analysis of potential transmission pathways in addition to comprehensive microbiological typing approaches.

## Acknowledgements

We thank Dr. T. Ito and Prof. K. Hiramatsu from the Faculty of Medicine, Department of Bacteriology at Juntendo University Tokyo, Japan for providing reference strains for SCCmec-typing and Esther-Maria Antao for critical review of the manuscript.

## References

- Bannermann, T., Peacock, S., 1999. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: Murray, P.R., Baron, E., Landry, F.C., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A. (Eds.), Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, DC, pp. 397-398.
- Bannoehr, J., Ben Zakour, N.L., Waller, A.S., Guardabassi, L., Thoday, K.L., van den Broek, A.H., Fitzgerald, J.R., 2007. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. J. Bacteriol. 189, 8685-8692.
- Bemis, D.A., Jones, R.D., Kania, S.A., 2008. Evaluation of interpretive breakpoint recommendations for detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs in the United States. Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens Poster abstr. in: ASM conference on June 15-18, 2008; Copenhagen, Denmark.
- Biberstein, E.L., Jang, S.S., Hirsh, D.C., 1984. Species distribution of coagulase-positive staphylococci in animals J. Clin. Microbiol. 19, 610-615.
- Boyle-Vavra, S., Ereshefsky, B., Wang, C.C., Daum, R.S., 2005. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCCmec) type VT or SCCmec type IV. J. Clin. Microbiol. 43, 4719-4730.
- Campanile, F., Bongiorno, D., Borbone, S., Venditti, M., Giannella, M., Franchi, C., Stefani, S., 2007. Characterization of a variant of the SCCmec element in a bloodstream isolate of *Staphylococcus intermedius*. Microb. Drug. Resist. 13, 7-10.
- Clinical And Laboratory Standards Institute, CLSI (2004) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. NCCLS document M31-S1. Wayne, PA
- Clinical And Laboratory Standards Institute, CLSI (2005) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S15. Wayne, PA.
- Cox, H.U., Hoskins, J.D., Newman, S.S., Foil, C.S., Turnwald, G.H., Roy, A.F., 1988. Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs Am.J. Vet. Res. 49, 747-751.
- Descloux, S., Rossano, A., Perreten, V., 2008. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. J. Clin. Microbiol. 46, 1818-1823.
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vanechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1569-1573.
- Griffeth, G.C., Morris, D.O., Abraham, J.L., Shofer, F.S., Rankin, S.C., 2008. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. Vet. Dermatol. 19, 142-149.
- Hanselman, B.A., Kruth, S., Weese, J.S., 2008. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. Vet. Microbiol. 126, 277-281.
- Hanssen, A.M., Kjeldsen, G., Sollid, J.U., 2004. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-

- resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 285-296.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K., 2001. Structural comparison of three types of staphy-lococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1323-1336.
- Ito, T., Ma, X.X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H., Hiramatsu, K., 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2637-2651.
- Merlino, J., Watson, J., Rose, B., Beard-Pegler, M., Gottlieb, T., Bradbury, R., Harbour, C., 2002. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 793-801.
- Moodley, A., Stegger, M., Ben Zakour, N.L., Fitzgerald, J.R., Guardabassi, L., 2009 Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (*spa*) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet. Microbiol.* 135, 320-326.
- Morris, D.O., Rook, K.A., Shofer, F.S., Rankin, S.C., 2006. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (200304). *Vet. Dermatol.* 17, 332-337.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., Hiramatsu, K., 2007a. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1118-1125.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., Hiramatsu, K., 2007b Re-classification of phenotypically identified *S. intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2770-2778.
- Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K., De Beenhouwer, H., 2006. First case of *S. pseudintermedius* infection in a human. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4609-4612.
- Vengust, M., Anderson, M.E., Rousseau, J., Weese, J.S., 2006. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 602-606.
- Walther, B., Wieler, L.H., Friedrich, A.W., Hanssen, A.M., Kohn, B., Brunnberg, L., Lubke-Becker, A., 2008. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Vet. Microbiol.* 127, 171-178.
- Weese, J.S., Dick, H., Willey, B.M., McGeer, A., Kreiswirth, B.N., Innis, B., Low, D.E., 2006. Suspected transmission of methicillin-resistant *S. aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Vet. Microbiol.* 115, 148-155

### 3.2 Publikation 2

#### **Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrugresistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe**

#### **Weitverbreitetes, plötzliches Auftreten einer bestimmten genetischen Linie Methicillin- und multiresistenter *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) in Europa**

Publiziert in *Veterinary Microbiology*,  
DOI: doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.008  
Eingereicht: 23.10. 2009  
Akzeptiert: 14.01.2010

##### **3.2.1 Zusammenfassung (Übersetzung der Originalpublikation)**

Um einen tieferen Einblick in den phylogenetischen Hintergrund und die Diversität Methicillin-resistenter *S. pseudintermedius* (MRSP) tierischen Ursprungs zu bekommen, wurden die genetische Verwandtschaft und die klonale Verbreitung von 146 europäischen MRSP mithilfe verschiedener molekularer und phänotypischer Typisierungsverfahren untersucht. Die MRSP Stämme wurden aus klinischem mikrobiologischen Untersuchungsgut gewonnen (hauptsächlich von Kleintieren), das zu diagnostischen Zwecken von verschiedenen Tierärzten zwischen 2005 und 2008 in veterinärmedizinische Labore eingeschickt wurde. Pulsfeldgel-Elektrophorese (PFGE) von SmaI-Makrorestriktionsfragmenten erlaubte die Differenzierung von fünf PFGE-Clustern, die in weitere Subtypen unterschieden werden konnten. Für die Zuordnung von Sequenztypen (ST) wurden repräsentative Stämme jedes PFGE-Subtypes mithilfe der Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) analysiert. Mit einer Ausnahme (ST5) gehörten all diese MRSP-Stämme zum ST71. Weiterhin ergab die Zuordnung von *spa*-Typisierungsergebnissen, dass die Mehrheit aller Stämme dem *spa*-Typ t02 angehört. Die weiteren, vereinzelt gefundenen *spa*-Typen t05 und t06 sowie zwei neue Typen (t15 und t23) wurden als nah verwandt zu t02 erkannt. Die Ergebnisse des PCR-basierten *SCCmec*-Typing ergaben *SCCmec*III als häufigsten Typ (n=138). Eine weitere, nicht-typisierbare *SCCmec*-Variante wurde in wenigen Stämmen (n=8) identifiziert. Zusätzlich wurden alle Stämme positiv per PCR für das Leukotoxin-kodierende Operon *LukI* und das *Staphylococcus intermedius* exfoliative Toxin (SIET) getestet.

Diese gesammelten Daten bezeichnen das Aufkommen einer bestimmten, multiresistenten MRSP-Abstammungslinie (ST71) in zentral- und südeuropäischen Ländern während der letzten Jahre.

##### **3.2.2 Publikation**

## Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe

Claudia Ruscher<sup>a</sup>, Antina Lübke-Becker<sup>a</sup>, Torsten Semmler<sup>a</sup>, Claus-G. Wleklinski<sup>b</sup>, Angela Paasch<sup>a</sup>, Alexandra Soba<sup>b</sup>, Ivonne Stamm<sup>c</sup>, Peter Kopp<sup>c</sup>, Lothar H. Wieler<sup>a</sup>, Birgit Walther<sup>a</sup>\*

<sup>a</sup> Institute of Microbiology and Epizootics (IMT), Veterinary Faculty, Freie Universität Berlin, Philippstraße 13, 10115 Berlin, Germany <sup>b</sup> Synlab-vet, Labor Augsburg, Leitershofer Straße 25, 86157 Augsburg, Germany <sup>c</sup> Vet Med Labor GmbH, Division of DEXX Laboratories, Morikestraße 28/3, 71636 Ludwigsburg, Germany

### ABSTRACT

In order to gain a deeper insight into the phylogenetic background and diversity of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) of animal origin, genetic relationships and clonal distribution among 146 European MRSP were examined using different molecular and phenotypical typing approaches. MRSP strains were derived from clinical microbiological specimens (mainly of small animal origin) sent in for diagnostic purposes from various veterinary facilities between 2005 and 2008. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Sma*I-macrorestriction fragments allowed differentiation of five PFGE-clusters that were subdivided into further distinct subtypes. Representatives of each PFGE subtype were analyzed by multilocus sequence typing (MLST) for assignment of sequence types (ST). With one exception (ST5), all these MRSP strains belonged to ST71. Furthermore, assessment of *spa*-typing results revealed that the majority of all strains harboured *spa* type t02. Further sporadically detected *spa* types t05 and t06 as well as two new types (t15 and t23), were found to be closely related to t02. According to PCR-based SCCmec-typing, SCCmecIII was the most prevalent type (n = 138), and solely one non-typeable variant was identified in several strains (n = 8). In addition, all strains were tested positive by PCR for the leukotoxin encoding operon *LukI* and the *Staphylococcus intermedius*-exfoliative toxin (SIET), respectively. Our cumulative data indicate a recent emergence of a certain multidrug-resistant MRSP-lineage (ST71) in central and southern European countries during the last few years.

## 1. Introduction

In veterinary medicine, methicillin-resistance in different staphylococcal species has emerged as a therapeutical and nosocomial challenge during the last decade (Ruscher et al., 2009; Walther et al., 2008, 2009a, b). In staphylococci of the *intermedius* group (SIG), methicillin-resistance has been reported sporadically since 1996 (Gortel et al., 1999; Piriz et al., 1996), but in recent years, we noticed a considerable increase in methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) in microbiological specimens from pets (Weese and van Duijkeren, 2009), posing a huge challenge for the medication of infected animals due to limited therapeutical options (Loeffler et al., 2007; Ruscher et al., 2009). Phylogenetic analysis of members of the *Staphylococcus intermedius* group (SIG) only recently revealed the existence of three closely related species (*S. intermedius*, *S. pseudintermedius* and *S. delphini*) and *S. pseudintermedius* turned out to be commonly misidentified as *S. intermedius* in the past (Bannoehr et al., 2007; Devriese et al., 2005; Sasaki et al., 2007b). Bannoehr et al. as well as Moodley et al. reported primary details about phylogenetic relations among *S. pseudintermedius* of different animal and human origins (Bannoehr et al., 2007; Moodley et al., 2009). In this report, we unravelled the genetic relatedness of 146 MRSP strains isolated from different animal sources and various geographical origins using molecular typing approaches like pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), a recently reported typing scheme for the putative staphylococcal protein A encoding gene (*spa*) in *S. pseudintermedius* (Moodley et al., 2009), and SCC*mec*-typing to get insight into the population structure of central and southern European MRSP. In addition, we screened for a presumptive Panton-Valentine leukocidin (PVL) analogue in *S. pseudintermedius* (LukI) and an exfoliative toxin encoding gene, specific for SIG (SIET).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling

Based on convenience samples, MRSP isolates investigated in this study were isolated from clinical specimens between June 2005 and December 2008 during routine microbiological diagnostic examinations in three veterinary diagnostic laboratories (IMT Berlin; Synlab-vet, Labor Augsburg; Vet Med Labor, Ludwigsburg). Some of these isolates (n = 46) were published in context of a former prevalence study concerning MRSP of animal origin (Ruscher et al., 2009). All facilities obtain their specimens from various geographic origins in Germany and from several other European countries.

### 2.2. Bacterial isolation and identification

Bacterial isolation and identification of *S. pseudintermedius* isolates as well as PCR-based detection of the methicillin-resistance encoding gene *mecA* and distinct exclusion of *S. aureus* was performed as described previously (Merlino et al., 2002; Ruscher et al., 2009; Sasaki et al., 2007b). All *mecA*-harbouring strains were included into further investigations.

### 2.3. Multilocus sequence typing (MLST)

DNA-sequence analysis of five different gene loci was performed according to Bannoehr et al. (2007). Analysis of the PFGE fingerprint patterns allowed preselection of

representatives of each single PFGE subtype (Fig. 1) for DNA-sequence typing of *pta*, *cpn60*, *tuf*, 16S rRNA and *agrD*. Primer sets for PCR amplification of *pta*, *cpn60*, *tuf*, 16SrRNA and *agrD* fragments were used as described by Bannoehr et al. Subsequent DNA-sequencing was accomplished by Agowa Sequencing Service (LGC's AGOWA Genomics; Berlin, Germany) and the resulting sequences were aligned with deposited sequences of *S. pseudintermedius* in the NCBI Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Assignment of sequence types was performed according to the scheme proposed by Bannoehr et al. using the software SeqSphere (Ridom, [www.ridom.de](http://www.ridom.de)).

#### 2.4. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Preparation of chromosomal DNA including incorporation into agarose plugs was performed in accordance with a previously published protocol (Murchan et al., 2003). After digestion of genomic DNA using endonuclease *Sma*I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany), separation of restriction fragments was performed by clamped homogenous electric field (CHEF) electrophoresis with a CHEF-DR III System (Bio-Rad Laboratories, California, USA) in a 1.2% agarose gel (peqGOLD Pulsed Field Agarose, peqLab Biotechnologie, Erlangen, Germany) taking into account running conditions (Soedarmanto et al., 1996) with few modifications. Initial switch time of 0.1 s to final switch time of 11 s, run time of 8 h, voltage 5 V/cm followed by an initial switch time of 9 s and final time of 45 s, run time 12 h, voltage 6V/cm, included angle 120°. Electrophoresis was performed in 0.5x Tris-borate-EDTA charged with 100 mM thiourea. Macrorestriction patterns were analyzed using Bionumerics software (version 4.6, Applied Maths, Gent, Belgium) to calculate Dice coefficients of correlation and for dendrogram generation by the unweighed pair group method using arithmetic averages (UPGMA) clustering. Optimization was set at 0.5% and position tolerance at 1.5%. Including DNA fragments between approximately 45 and 650 kb, the strains were clustered regarding 80% homology as a cut-off-criterion. Each cluster was subdivided by visible band differences and assigned to distinct subtypes.

#### 2.5. *Spa*-typing

Based on the deposited, presumptive staphylococcal protein A-sequence of *S. pseudintermedius* ED99 (NCBI GenBank accession number: EU930814) we designed oligonucleotide primers for amplification of the polymorphic X-region in *spa* (*spa*A-F: aagtagtgatattcttgct and *spa*C-R: ccaggttgaacgacatgcat). PCR amplification of the *spa* gene fragment was performed using the following conditions: initial denaturation (5 min at 94 °C), followed by 25 cycles of denaturation (30 s at 94 °C), annealing (30 s at 57 °C), extension (72 °C for 30 s) and single final extension for 10 min at 72 °C. Purification of resulting PCR-products and DNA-sequence analysis was performed by AGOWA sequence service (AGOWA GmbH; Berlin, Germany). For assignment of *spa* types in this study, we used the *spa*-typing Plugin originally developed for *S. aureus* together with Bionumerics (version 4.6, Applied Maths, Gent, Belgium). In order to use it for *S. pseudintermedius*, we modified the sequence recognition settings: the 5'-signature was defined as 'AATAATTCA' and the 3'-signature as 'GACAAAGCG'. The repeats and types were defined according to the scheme proposed by Moodley et al. (2009).

## 2.6. SCCmec-typing

PCR-based determination of staphylococcal cassette chromosome-*mec* (SCC*mec*) types was performed using a broad composition of primer sets for amplification of relevant elements of the *ccr*- and *mec*-complex as well as distinct components of the junkyard-regions. Primerpairs for *ccrA1*, *ccrB1*, *ccrA2*, *ccrB2*, *ccrA3*, *ccrB3*, *mecI*, *mecRA*, *mecRB*, and IS 1272 were used as described by Hanssen et al. (Hanssen et al., 2004). According to previously published data, oligonucleotide primer pairs for amplification of internal gene fragments of *ccrAB4* (Boyle-Vavra et al., 2005), *ccrC* (Ito et al., 2004), pT181 (Ito et al., 2001) and the *mer*-operon (Chongtrakool et al., 2006) were used. Strains N315, WIS, 85/2082, NCTC 10442 and CECT 231 were used as reference strains.

## 2.7. LukI and SIET detection

PCR-based detection of the LukI-operon (LukS and LukF) as well as the detection of the *Staphylococcus intermedius*-exfoliative toxin (SIET) was performed as described in previous studies (Futagawa-Saito et al., 2004; Lautz et al., 2006).

## 2.8. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs)

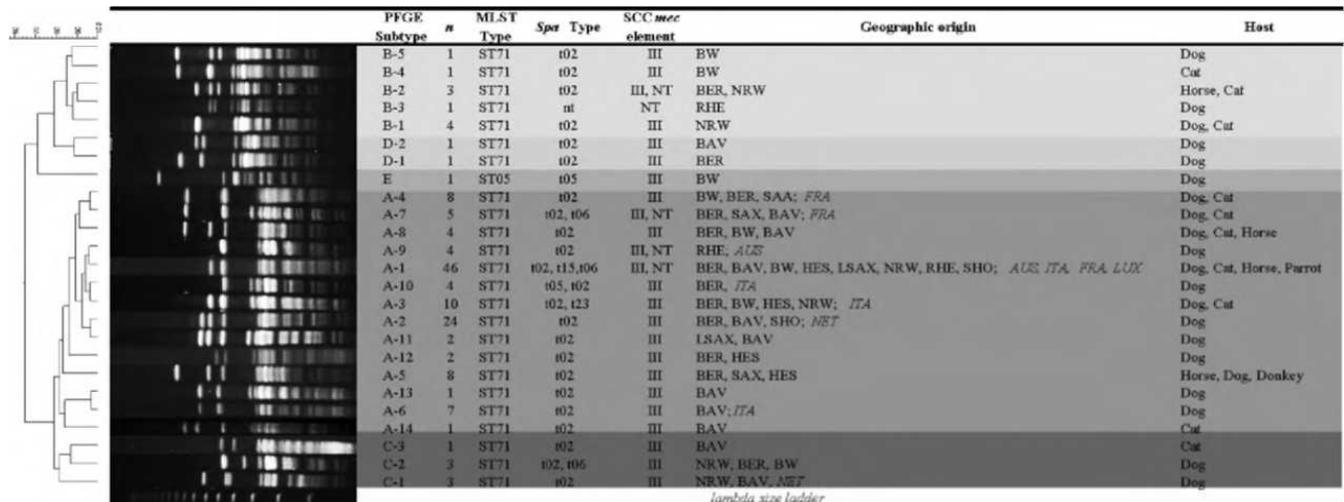
Antimicrobial susceptibility testing was accomplished using broth microdilution method with automated BD Phoenix System according to CLSI guidelines (Clinical And Laboratory Standards Institute, 2007). The tested panel included the following non- $\beta$ -lactam antimicrobials: erythromycin, clindamycin, vancomycin, teicoplanin, fusidic acid, linezolid, rifampicin, gentamicin, tobramycin, levofloxacin, ciprofloxacin, tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazol. CLSI breakpoints were considered for MIC interpretation (Clinical And Laboratory Standards Institute, M31-S1, 2004; M100-S17, 2007) and *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299 and *S. aureus* ATCC 25923 reference strains were used as internal quality control assurance.

## 3. Results

Convenience samples of 146 methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) isolated from six different animal species between the years 2005 and 2008 were included in this study (dogs: n = 111; cats: n = 21; horses: n = 9; one donkey, one parrot and three strains of undisclosed animal species). The isolated MRSP originated from a total of six European countries. Most of the strains were derived from ten different German federal states, with the majority from Bavaria and Berlin (Berlin, n = 39; Bavaria, n = 39; Baden-Württemberg, n = 14; North-Rhine-Westphalia, n = 14; Hesse, n = 7; Rheinland-Pfalz, n = 6; Lower Saxony, n = 4; Schleswig-Holstein, n = 4; Saxony, n = 2; Saarland, n = 1). In addition, 16 strains were derived from five other European countries (i.e. Netherlands, n = 2; France, n = 4; Italy, n = 6; Austria, n = 3; Luxembourg, n = 1).

The strains were obtained from clinical samples of animal patients with various clinical anamneses. In detail, a majority of the strains (n = 66; 45.21%) was isolated from infected wounds; 17.81% were isolated from samples of the auditory channel; 12.33% derived from the urinary tract and 10.96% were isolated from skin or soft tissue. In addition, other body sites of specimen origin were: respiratory tract (4.11%), eye and conjunctiva (4.11%), gastrointestinal tract (1.37%) and joint aspirate (1.37%). Medical backgrounds were not known for 2.74% of the strains.

Fig. 1. PFGE-based dendrogram, providing representative PFGE subtypes of 146 *mecA*-positive *S. pseudintermedius* associated with ST-, *Spa*- and *SCCmec*-types as well as geographic origins of isolation and hosts. Particular PFGE-clusters are displayed and highlighted in different shading.



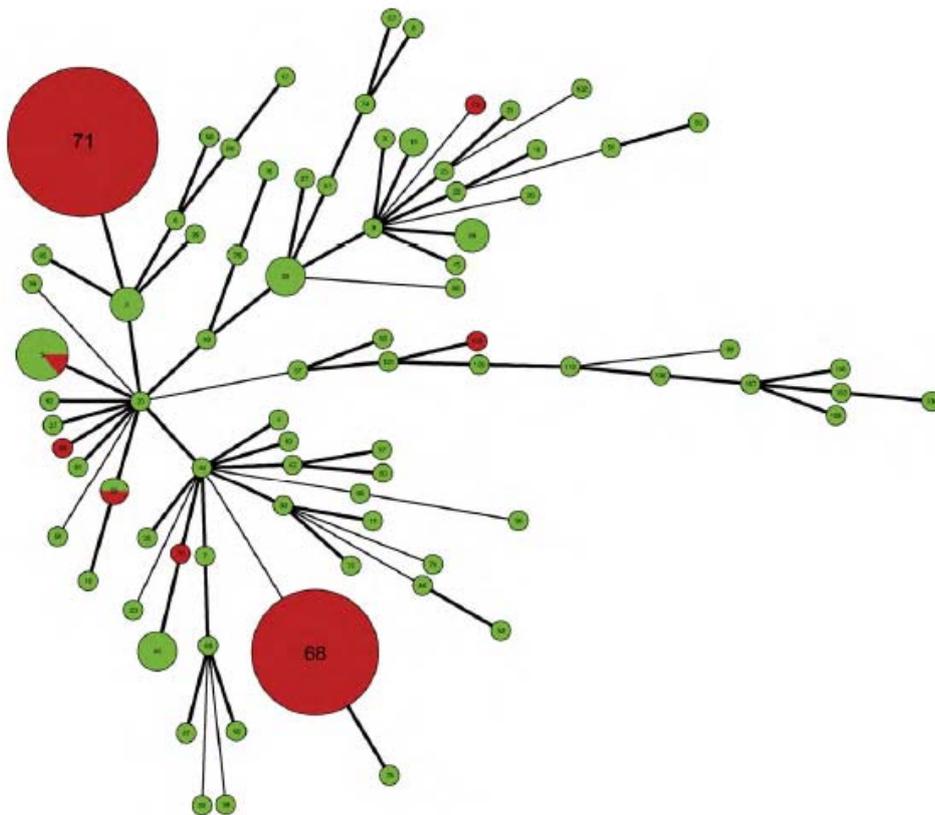
Abbreviations: NT: non-typeable.  
 German federal states: BW: Baden-Württemberg; BAV: Bavaria; BER: Berlin; HES: Hesse; LSAX: Lower Saxony; NRW: North-Rhine-Westphalia; RHE: Rheinland-Pfalz; SHO: Schleswig-Holstein; SAX: Saxony  
 Other European countries: AUS: Austria; FRA: France; NET; Netherlands; ITA: Italy; LUX: Luxemburg.

### 3.1. Multilocus sequence typing (MLST)

MLST was performed on 47 MRSP strains, regarding several representatives of each single PFGE subtype (Fig. 1). ST71 clearly dominated the STs represented by n = 46 strains. One MRSP (PFGE cluster E) was assigned to ST5 (see Fig. 1). A minimum spanning tree (Fig. 2) of 89 STs was generated and population structure was analyzed including MSSP and MRSP phylotype data published so far (Bannoehr et al., 2007; Black et al., 2009; Descloux et al., 2008). Within the tree, MRSP strains were found to belong to eight different very distantly related STs, and predominance of certain MRSP-STs in different geographical areas (USA ST68; Europe ST71) is obvious (Bannoehr et al., 2007; Black et al., 2009; Moodley et al., 2009). On the other hand, MSSP-STs seem to be much more heterogeneous. However, ST29 and ST5 are shared by *mecA*-positive as well as *mecA*-negative strains.

Fig. 2

Minimum spanning tree based on MLS types of *mecA*-positive *S. pseudintermedius* isolates of our study in association with sequence data of previously published MLST-results (Bannoehr et al., 2007; Black et al., 2009; Descloux et al., 2008). Circle size is proportional to sequence-type frequency and colours indicate the existence of *mecA* (red: MRSP; green: MSSP). Phylogenetic separation between MSSP and MRSP is demonstrated: MSSP are shown to branch out into a wider range of sequence types, while MRSP isolates are limited to eight different MLS types, of which ST68 is predominant in North America (Black et al., 2009). ST 29, 69, 70 and 71 are commonly found in central and northern Europe, where ST71 is absolutely predominant (Bannoehr et al., 2007; Moodley et al., 2009). ST5 was only detected in four European MSSP isolates before and is now determined in a single German MRSP. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)



### 3.2. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

By using the endonuclease *Sma*I, all 146 strains were typeable (100% typeability), revealing five major PFGE-clusters (A, B, C, D and E). Differentiated subtypes were designated using numerals (Fig. 1). The vast majority of strains ( $n = 126$ ) was assigned to PFGE cluster A, harbouring a total of 14 subtypes (A1-A14), dominated by PFGE subtype A-1 ( $n = 46$  strains). PFGE-cluster B was shared by ten strains and further subdivided into B1-B5. Altogether six strains were assigned to PFGE-cluster-C (subtypes C1-C3). Only two strains belonged to PFGE-cluster-D, composed of subtypes D1 and D2, while PFGE cluster E was represented by a single strain. Detailed results of

PFGE-typing with exemplary fingerprint patterns representing all strains investigated here in addition to their geographic origin are depicted in Fig. 1.

### 3.3. *Spa*-typing

Sequence analysis of the tandem repeat region of the *spa* gene was performed for all 146 strains and except for a single isolate, all of them yielded *spa*-PCR-products. A total of 136 MRSP (93.15%) were assigned to *spa* type t02, four (2.4%) belonged to t05, and three strains (2.1%) were determined as t06. Two new *spa* types were detected and denominated in accordance with Moodley et al. *Spa* type t15 (Repeat sequence: r01r02r03r03r03r03r03r06r05; access. no. V) derived from a canine ear swab in Bavaria (IMT12559), and a further strain was associated with t23 (repeat sequence: r01r02r03r06r05, access, no. V), isolated from a urine sample of a cat (IMT17330) in Baden-Württemberg. Both isolates share PFGE-cluster A (subtypes A1 and A3) and ST71. Regarding the five different repeat sequences of *spa* types associated with ST71 (t02, t05, t06, t23 and t15), all types were considered to be closely related as they differed merely in the total number of central r03 repeats. *Spa* type t05 was also identified in the unique ST5 (PFGE cluster E, ST 5) MRSP isolate (Fig. 1) and the further t05-harboursing isolates from Berlin shared the same PFGE-type (subtype A10) and ST (ST71). Isolates associated with t05 were derived from two different regions (one from Baden-Württemberg and three from Berlin); but all were isolated from dogs affected by skin infections. No obvious commonalities were recognized between the isolates sharing t06 (animal species: two dogs and one cat; regions: Berlin, North-Rhine-Westphalia and Bavaria, body site of infection: wound infection, skin and ear-infection; PFGE subtypes: C2, A1 and A7; see Fig. 1).

### 3.4. *SCCmec*-typing

PCR-based *SCCmec*-typing yielded positive signals for *ccrA3*, *ccrB3*, pT181, *mecI*, *mecRA*, *mecRB* in 138 isolates, which assigns these strains to *SCCmecIII*. Eight more isolates harboured the characteristic elements of *SCCmecIII*, but they additionally showed signals for *ccrA2* and *ccrB2* and were therefore designated as non-typeable (NT). These eight strains shared four different subtypes of PFGE cluster A (A1, A2, A4 and A10) and are linked to ST71, *spa* type t02, as well as to the single *spa*-non-typeable variant (Fig. 1).

### 3.5. *LukI* and SIET detection

All 146 strains showed positive PCR-results for both constituents of the *LukI*-operon (Luk-F and Luk-S) as well as the *Staphylococcus intermedius*-exfoliative toxin (SIET). Sequencing of the amplified gene fragments of three randomly chosen MRSP isolates in this study and comparing with sequences obtained at NCBI GenBank revealed homology with the gene fragments with deposited *LukI* and SIET sequences.

### 3.6. Antimicrobial susceptibility testing (MIC)

Each of the 146 strains displayed resistance to erythromycin, clindamycin, gentamicin, levofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazol. Phenotypical resistance testing against tetracycline yielded heterologous results, i.e. 59.73% being resistant, 34.89% being susceptible and 5.36% displaying an intermediate phenotype. The single MRSP constituting PFGE cluster E (see below) and a few other strains diverged from the

observed multiresistance by showing sensitivity against clindamycin, erythromycin and ciprofloxacin (see Table 1). None of the MRSP yielded resistance against vancomycin, teicoplanin, fusidic acid, linezolid or rifampicin. Details of antimicrobial resistance profiling are given in Table 1.

Table 1

Results of MIC-determination for 14 non- $\beta$ -lactam-based antimicrobial agents of 146 *mecA*-positive *S. pseudintermedius*.

Antimicrobial agent <sup>a</sup>	MIC range ( $\mu\text{g/ml}$ )	Resistant	(%)	Intermediate	(%)	Susceptible	(%)
Clindamycin	<0.5 - 2	144	98.6	0	0	2	1.4
Ciprofloxacin	<0.5 - 2	140	95.9	2	1.4	4	2.7
Erythromycin	<0.25 - 4	144	98.6	0	0	2	1.4
Fusidic acid	<4-8	0	0	1	0.7	145	99.3
Gentamicin	<2 - 8	145	99.3	0	0	1	0.7
Levofloxacin	<1 - 4	143	97.9	0	0	3	2.1
Linezolid	<1-4	0	0	0	0	146	100
Rifampin	<0.5	0	0	0	0	146	100
Teicoplanin	<1	0	0	0	0	146	100

Abbreviations: NA, no CLSI-approved breakpoints available. <sup>a</sup> Breakpoints according to Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI), approved standard M100-S17, M31-S1.

#### 4. Discussion

ST71 has previously been reported for MRSP from Germany and Sweden (Bannoehr et al., 2007; Moodley et al., 2009), and the vast majority of investigated PFGE subtypes in this study was found to belong to ST71 as well. Taking into consideration that MRSP-isolation rates are rising steadily in recent years (Weese and van Duijkeren, 2009), strains sharing this genetic background seem to have spread in an amazingly short period of time through large parts of Europe. This is particularly remarkable, since MRSP reported here were mostly isolated from small animals, usually living in individual households.

Alternatively, ST71 could represent a very successful *S. pseudintermedius*-lineage that has coevolved with the canine host and disseminated widely in European countries in the past, being a well recipient for certain SCC*mec* variants from a so far unknown source. A strong argument against this view is the current lack of ST71 MSSP. Up to now, MRSP are only associated with STs 29,68,69, 70, 71, 73 and 105, which is a very restricted number compared to the numerous STs of *mecA*-negative *S. pseudintermedius* (Bannoehr et al., 2007; Black et al., 2009; Descloux et al., 2008; Moodley et al., 2009). However, one MRSP in our study (IMT-14532) belonged to ST5, which has been reported solely for *mecA*-negative isolates from Belgium (Bannoehr et al., 2007) so far. Thus, acquisition of SCC*mec* has also occurred in a further *S. pseudintermedius*-lineage. In contrast to previously published studies (Moodley et al., 2009; Norstrom et al., 2009), every MRSP isolate investigated here was typeable using SmaI-macrorestriction. Comparing our PFGE- and MLST-typing data of MRSP with recently published results for *mecA*-negative *S. pseudintermedius* (MSSP) (Norstrom et al., 2009), a higher clonal diversification of MSSP is evident and visually recognizable in the MLST-based

minimum spanning tree provided in Fig. 2. Regarding the *spa*-typing results of our strains, the majority of strains (93.15%) share t02, which has been previously reported as a predominant *spa* type in Germany (Moodley et al., 2009). In this study, *spa* types t05 and t06 were detected sporadically, and even two new *spa* types were defined (t15 and t23). However, these five ST71-associated *spa* types differ only slightly by the number of a certain repeat (one to five r03-repeats) at a central position on the *spa* gene. Therefore, variations in ST71 related *spa* types were possibly a result of repeated loss of r03-repeats by deletion events, like it has been assumed for closely related ST5-associated *spa* types in *Staphylococcus aureus* very recently (Nübel et al., 2008). So far, *spa* type t06 has been reported for four American isolates associated with ST68 and ST70 (Moodley et al., 2009). However, here we report t06 for different European ST71 isolates (Fig. 1). In addition, before any further interpretation of variation in *spa* genes of *S. pseudintermedius* can be made, investigation of the functional aspects (including MSSP) of this presumptive *spa* gene is necessary. PVL, a bicomponent leukotoxin, which is cytotoxic for polymorphonuclear cells, macrophages and monocytes, is often associated with severe *S. aureus*-infections of skin and soft tissue or necrotizing pneumonia in humans, frequently leading to lethal infection progress (Gillet et al., 2007). The PVL-related operon *LukI* and the exfoliative gene *SIET* seem to belong to all MRSP investigated here, not showing any specific relation to animal species or body site of infection. However, the sheer detection of gene fragments cannot give any satisfactory conclusion concerning the adaptation of phylotypes to host species or body tissue. Investigation of gene-expression for *LukI* and its role as a virulence factor in animals may provide further insights in this matter. This may be of particular interest since the occurrence and expression of PVL in *S. aureus* was proven to interact with the expression of other virulence genes, especially for *spa* (Labandeira-Rey et al., 2007).

Comparing resistance profiles of MRSP strains of this study (Table 1) with data reported for SIG of different origins, multiple resistances were observed before (Futagawa-Saito et al., 2007; Ruscher et al., 2009). Previous studies also revealed a common resistance of MSSP-isolates towards penicillin, fusidic acid and tetracycline (Norstrom et al., 2009) and if multiple resistances in *mecA*-negative strains were observed, these isolates were usually found in specimens from dogs that were potentially exposed to antimicrobial therapy in the past (Hartmann et al., 2005). Although in previous studies even *SCCmecV*, a truncated version of *SCCmecV*, another variant *SCCmecII-III*, *SCCmecVII* and *SCCmec*-non-typeable strains were reported sporadically for MRSP (Black et al., 2009; Descloux et al., 2008; Moodley et al., 2009; Sasaki et al., 2007a), *SCCmecIII* seems to be the most prevalent *SCCmec* type in European MRSP isolates (Moodley et al., 2009; Ruscher et al., 2009). Since *SCCmecIII* is known to harbour additional resistance genes like *tetK*, or *ermA* (Ito et al., 2003) a possible correlation of *SCCmecIII* and the considerable multiresistance in MRSP could be an important aspect of further studies.

Up to now, complete genome sequence data of *S. pseudintermedius* is still missing. In order to obtain more detailed insights into the population nature of *S. pseudintermedius*, especially in view of the recent pan-European emergence of MRSP, we recommend to extend the MLST-scheme proposed by Bannoehr et al. for *S. pseudintermedius* (Bannoehr et al., 2007) by including two further housekeeping genes. MLST-schemes with seven integrated internal gene fragments are standard for *S. aureus*, *S. epidermidis* and *Streptococcus pneumoniae* which makes detection of further allelic variations possible. Furthermore, additional employment of other molecular typing methods (e.g. analysis of single nucleotide polymorphisms [SNPs]) may provide

refined data. For instance, Nübel et al. found evidence for multiple acquisitions of *mecA* by a certain genetic MRSA-lineage (ST5) in addition to limited geographic strain dispersal by use of SNPs, which may have formerly led to a misinterpretation suggesting a global spread of a single MRSA strain (Nübel et al., 2008). Furthermore, cluster analysis of DNA macrorestriction patterns performed in our study (Fig. 1) may indicate existence of MRSP (sub-) clones within ST71, possibly not resolved by MLST so far, like it has been assumed for MRSA-PFGE-types within ST5 (Nübel et al., 2008). Taken together, widespread emergence of predominantly multidrug-resistant MRSP-ST71 within a short period of time is difficult to explain—a fact that clearly needs further epidemiological as well as biological investigations to gain more detailed data concerning this major clinical challenge in veterinary medicine.

### Acknowledgements

The authors thank Ross Fitzgerald and Vincent Perreten for helpful advice on assignment of MRSP-sequence types; Keiichi Hiramatsu and Takashi Sasaki for providing reference strains for SCC*mec*-typing as well as Arshnee Moodley for assignment of hitherto unpublished *spa* types and Esther-Maria Antao for critical review of the manuscript. Torsten Semmler was funded by a grant from the Federal Ministry of Education and Research Network Zoonoses (FBI-Zoo, Grant no. 01KI07120).

### References

- Bannoehr, J., Ben Zakour, N.L., Waller, A.S., Guardabassi, L., Thoday, K.L., van den Broek, A.H., Fitzgerald, J.R., 2007. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J. Bacteriol.* 189, 8685-8692
- Black, C.C., Solyman, S.M., Eberlein, L.C., Bemis, D.A., Woron, A.M., Kania, S.A., 2009. Identification of a predominant multilocus sequence type, pulsed-field gel electrophoresis cluster, and novel staphylococcal chromosomal cassette in clinical isolates of *mecA*-containing, methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet. Microbiol.*
- Boyle-Vavra, S., Ereshefsky, B., Wang, C.C., Daum, R.S., 2005. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type VT or SCC*mec* type IV. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4719-4730.
- Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X.X., Kondo, Y., Trakulsomboon, S., Tiensa-sitorn, C., Jamklang, M., Chavalit, T., Song, J.H., Hiramatsu, K., 2006. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50, 1001-1012.
- Clinical And Laboratory Standards Institute, C., 2004. CLS1 document M31-S1. 1n Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, Wayne, PA.
- Clinical And Laboratory Standards Institute, C., 2007. CLS1 approved standard supplement M100-S17. In Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Wayne, PA
- Descloux, S., Rossano, A., Perreten, V., 2008. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1818-1823.
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1569-1573.

- Futagawa-Saito, K., Ba-Thein, W., Fukuyasu, T., 2007 High occurrence of multi-antimicrobial resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from healthy and diseased dogs and domesticated pigeons. Res. Vet. Sci. 83, 336-339.
- Futagawa-Saito, K., Sugiyama, T., Karube, S., Sakurai, N., Ba-Thein, W., Fukuyasu, T. 2004 Prevalence and characterization of leukotoxin-producing *Staphylococcus intermedius* in isolates from dogs and pigeons J. Clin. Microbiol. 42, 5324-5326.
- Gillet, Y., Vanhems, P., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Floret, D., Etienne, J., 2007 Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin. Clin. Infect. Dis. 45, 315-321.
- Gortel, K., Campbell, K.L., Kakoma, I., Whittam, T., Schaeffer, D.J., Weisiger, R.M., 1999 Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. Am. J. Vet. Res. 60, 1526-1530.
- Hanssen, A.M., Kjeldsen, G., Sollid, J.U., 2004 Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? Antimicrob. Agents Chemother. 48, 285-296.
- Hartmann, F.A., White, D.G., West, S.E., Walker, R.D., Deboer, D.J., 2005. Molecular characterization of *Staphylococcus intermedius* carriage by healthy dogs and comparison of antimicrobial susceptibility patterns to isolates from dogs with pyoderma. Vet. Microbiol. 108, 119-131.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K., 2001 Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1323-1336.
- Ito, T., Ma, X.X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H., Hiramatsu, K., 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC* Antimicrob. Agents Chemother 48, 2637-2651
- Ito, T., Okuma, K., Ma, X.X., Yuzawa, H., Hiramatsu, K., 2003 Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist. Updat. 6, 41-52.
- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E.L., Bes, M., Benito, Y., Barbu, E.M., Vazquez, V., Hook, M., Etienne, J., Vandenesch, F., Bowden, M.G., 2007. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science 315, 1130-1133.
- Lautz, S., Kanbar, T., Alber, J., Lammler, C., Weiss, R., Prenger-Berninghoff, E., Zschock, M., 2006. Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health 53, 434-438.
- Loeffler, A., Linek, M., Moodley, A., Guardabassi, L., Sung, J.M., Winkler, M., Weiss, R., Lloyd, D.H., 2007. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. Vet. Dermatol. 18, 412-421.
- Merlino, J., Watson, J., Rose, B., Beard-Pegler, M., Gottlieb, T., Bradbury, R., Harbour, C., 2002. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. J. Antimicrob. Chemother. 49, 793-801.
- Moodley, A., Stegger, M., Ben Zakour, N.L., Fitzgerald, J.R., Guardabassi, L., 2009. Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (*spa*) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet. Microbiol. 135, 320-326.
- Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjo, U., Coombes, G., Cookson, B., 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J. Clin. Microbiol. 41, 1574-1585.

- Norstrom, M., Sunde, M., Tharaldsen, H., Mork, T., Bergsjø, B., Kruse, H., 2009. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* in the Norwegian dog population. *Microb. Drug Resist.*
- Nübel, U., Roumagnac, P., Feldkamp, M., Song, J.H., Ko, K.S., Huang, Y.C., Coombs, G., Ip, M., Westh, H., Skov, R., Struelens, M.J., Goering, R.V., Strommenger, B., Weller, A., Witte, W., Achtman, M., 2008. Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14130-14135.
- Piriz, S., Valle, J., Mateos, E.M., de la Fuente, R., Cid, D., Ruiz-Santaquiteria, J.A., Vadillo, S., 1996. In vitro activity of fifteen antimicrobial agents against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus intermedius*. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 19, 118-123.
- Ruscher, C., Lübke-Becker, A., Wleklinski, C.G., Soba, A., Wieler, L.H., Walther, B., 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Vet. Microbiol.* 136, 197-201.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., Hiramatsu, K., 2007a. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1118-1125.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., Hiramatsu, K., 2007b. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2770-2778.
- Soedarmanto, I., Pasaribu, F.H., Wibawan, I.W., Lammler, C., 1996. Identification and molecular characterization of serological group C streptococci isolated from diseased pigs and monkeys in Indonesia. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2201-2204.
- Walther, B., Wieler, L.H., Friedrich, A.W., Hanssen, A.M., Kohn, B., Brunnberg, L., Lübke-Becker, A., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Vet. Microbiol.* 127, 171-178.
- Walther, B., Monecke, S., Ruscher, C., Friedrich, A.W., Ehrlich, R., Slickers, P., Soba, A., Wleklinski, C.G., Wieler, L.H., Lübke-Becker, A., 2009a. Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 47, 704-710.
- Walther, B., Wieler, L.H., Friedrich, A.W., Kohn, B., Brunnberg, L., Lübke-Becker, A., 2009b. *Staphylococcus aureus* and MRSA colonization rates among personnel and dogs in a small animal hospital: association with nosocomial infections. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 122, 178-185.
- Weese, J.S., van Duijkeren, E., 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.*

## 4 Ergänzungen und unveröffentlichte Daten

Da in beiden Publikationen dieser Arbeit jeweils der Fokus klar auf einen bestimmten Aspekt gerichtet wurde (Prävalenz von MRSP bzw. phylogenetischer Hintergrund von MRSP), sind einige Daten und Ergebnisse der Arbeit nicht im Rahmen der beiden Publikationen dargestellt und diskutiert worden. Sie sollen daher im Folgenden als zusätzliche Informationen präsentiert werden.

### 4.1 Möglicher nosokomialer Zusammenhang verschiedener MRSP Isolate

Die in dieser Arbeit typisierten MRSP-Isolate stammen aus klinischem Probenmaterial, das aus verschiedenen Tierarztpraxen und Kliniken in drei Untersuchungslabore eingeschickt wurde. Um die Bedeutung von MRSP als nosokomialen Infektionserreger näher zu beleuchten, sollen im folgenden Abschnitt zunächst die MRSP-Isolate, die aus Tierkliniken stammen, hinsichtlich ihrer Vorberichte genauer betrachtet werden. Weiterhin sollen diese Isolate hinsichtlich ihres möglichen zeitlichen Zusammenhangs unter Berücksichtigung der molekularen Typisierungsergebnisse dargestellt werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass keine epidemiologischen Analysen vor Ort in den Kliniken erfolgt sind, sondern eine retrospektive Typisierung von Isolaten, die über einen Zeitraum von mehreren Jahren gesammelt wurden. Identische PFGE-Bandenmuster von Isolaten derselben Einrichtung, die auch in zeitlichem Zusammenhang stehen, können also lediglich als Hinweis auf ein nosokomiales Infektionsgeschehen im Sinne eines Ausbruchs betrachtet werden.

#### 4.1.1 Überblick über Anzahl, Art und Verteilung der einsendenden Einrichtungen

Insgesamt setzt sich das untersuchte Stammkollektiv (146 MRSP-Isolate) aus Material von 85 verschiedenen Einsendern zusammen, der überwiegende Anteil (n= 100; 68,5%) wurde aus klinischen Einrichtungen in ganz Deutschland und angrenzenden europäischen Ländern isoliert.

**Tabelle 5:**

**Anzahl und Art der Einsender, aus deren Probenmaterial im Zeitraum Juni 2005 bis Dezember 2008 MRSP isoliert wurden**

Anzahl der Einsender		Art der Einsender	Anzahl der Isolate	
n	(%)		(%)	n
<b>41</b>	<b>48,2</b>	<b>Tierkliniken</b>	<b>68,5</b>	<b>100</b>
8		mehrfach MRSP aus derselben Klinik isoliert		67
33		einmalig MRSP isoliert		33
<b>44</b>	<b>51,8</b>	<b>sonstige (Tierarztpraxis, Ambulanz, Labor)</b>	<b>31,5</b>	<b>46</b>
1		mehrfach MRSP aus derselben Einrichtung isoliert		3
43		einmalig MRSP isoliert		43
<b>85</b>		<b>total</b>		<b>146</b>

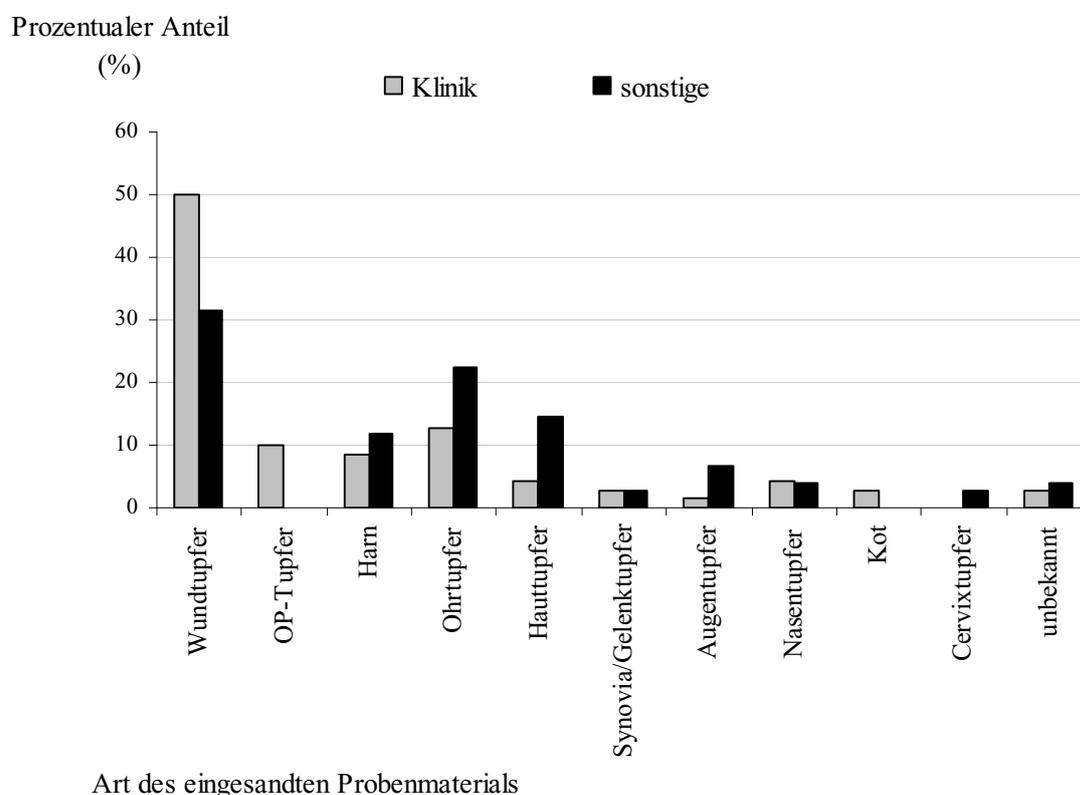
Aus neun Einrichtungen (acht Tierkliniken und eine Tierarztpraxis) wurden im Laufe des Untersuchungszeitraums von Juni 2005 bis Dezember 2008 jeweils mehrfach MRSP aus eingesandtem mikrobiologischem Untersuchungsgut isoliert. Die acht Tierkliniken sind dabei mit unterschiedlich vielen isolierten MRSP vertreten (Klinik A: n=31; Klinik B: n= 8; Klinik C: n=13; Klinik D: n=3; Klinik E: n=4; Klinik F: n=2; Klinik G: n=2; Klinik H: n=4), aus dem Material einer Tierarztpraxis wurden drei MRSP isoliert.

#### 4.1.2 Art des Probenmaterials der 146 MRSP in Abhängigkeit von der Art der einsendenden Einrichtung

Insgesamt besteht der weit überwiegende Anteil des eingesandten Probenmaterials, aus dem MRSP isoliert wurden aus Wundtupfern bzw. intraoperativen (OP-) Tupfern (45,2%).

Bei der Darstellung der Verteilung des eingesandten Probenmaterials in Abhängigkeit von der Art der einsendenden Einrichtung (Klinik oder andere Einrichtung) werden Unterschiede in der Häufigkeit speziell für Wundtupfer deutlich. Bei eingesandtem Material aus Kliniken beträgt der Anteil von Wundtupfern, aus denen MRSP isoliert wurden 52%. In den anderen Einrichtungen liegt der Anteil von Wundtupfern, aus denen MRSP isoliert wurden bei 26,1%.

**Abbildung 1:**  
**Prozentuale Verteilung des eingesandten Probenmaterials, aus dem MRSP im Rahmen dieser Arbeit isoliert wurden; getrennt dargestellt für Kliniken und andere Einrichtungen (Praxen, Ambulanzen etc.)**



Bei dieser Darstellung ist zu berücksichtigen, dass die Zusammensetzung des eingesandten Probenmaterials von Kliniken und Tierarztpraxen sich vermutlich generell und insbesondere bezüglich der Häufigkeit von Material aus (Operations-)Wunden unterscheidet. Da in Kliniken womöglich häufiger Operationen und andere invasive Eingriffe vorgenommen werden und (mehr) stationäre Patienten aufgenommen sind, wird der Anteil von (postoperativen) Wundtupfern bzw. intraoperativen Tupfern unter Umständen in Tierkliniken insgesamt größer sein als in Tierarztpraxen oder Ambulanzen, wo vermutlich der relative Anteil von z.B. Ohrtupfern und Hauttupfern größer ist. Informationen über die gesamte Zusammensetzung des Probenmaterials aus Kliniken und anderen Einrichtungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht erhoben, und lassen daher keinen direkten Vergleich zu. Dennoch ist zu erkennen, dass über die Hälfte (52%) der MRSP, die aus Kliniken isoliert wurden, aus infizierten Wunden stammen, dort also möglicherweise bedeutend im Zusammenhang mit postoperativen Wundinfektionen sein können.

#### **4.1.3 MRSP aus Tierkliniken**

Alle MRSP-Isolate aus Proben der acht Tierkliniken (Klinik A bis H) mit mehrfachem Auftreten von MRSP, werden im Folgenden vergleichend dargestellt.

Die Isolate sind entsprechend ihres jeweiligen Einsendedatums sortiert, um eine mögliche zeitliche Assoziation in Zusammenhang mit den Ergebnissen der molekularen Typisierung stellen zu können.

Als enger Zeitabstand zwischen den Einsendungen verschiedener Isolate wurde ein Zeitraum von 0 bis 14 Tagen erachtet. Ein möglicher zeitlicher Zusammenhang verschiedener Isolate wurde bei Abständen von 14 Tagen bis einem Monat gesehen. Isolate derselben Einrichtung, die identische Makrorestriktionsmuster zeigen und in engen Zeitabständen (0 bis 14 Tage) eingesandt wurden, sind in den folgenden Tabellen rot unterlegt. Isolate, die zeitlich möglicherweise assoziiert sind (14 Tage bis 1 Monat) und identischen Makrorestriktionsmustern angehören sind gelb unterlegt. Da epidemiologische Nachweise und Analysen in den einzelnen Kliniken nicht Teil dieser Arbeit sind, können diese Zusammenhänge auch bei identischen Makrorestriktionsmustern nur als Hinweise auf eine mögliche nosokomiale Assoziation im Sinne eines Ausbruchs betrachtet werden, keinesfalls jedoch als Beleg.

**Tabelle 6: Klinik A**
**31 Methicillin-resistente *S. pseudintermedius* (MRSP): Datum der Einsendung, Tierart, Art des Probenmaterials, Ergebnisse der molekularen Typisierung**

Datum der Einsendung	Tierart	Probenmaterial	PFGE Cluster	PFGE Subtyp	SCCmec Element	Sequenz Typ	spa-Typ
08.06.2005	Hund	Wundtupfer	A	A2	SCCmec III	ST71	t02
08.06.2005	Hund	Wundtupfer	A	A2	SCCmec III		t02
30.06.2005	Hund	Wundtupfer	A	A2	SCCmec III		t02
18.07.2005	Hund	Nasensekret	A	A2	SCCmec III		t02
09.08.2005	Hund	Wundtupfer	A	A2	SCCmec III		t02
05.10.2005	Hund	Wundtupfer	A	A2	SCCmec III		t02
07.11.2005	Hund	Wundtupfer	A	A7	SCCmec III	ST71	t02
14.09.2006	Hund	Tupfer	A	A1	SCCmec III		t02
31.10.2006	Hund	Wundtupfer	A	A1	SCCmec III	ST71	t02
01.11.2006	Hund	Wundtupfer	A	A1	SCCmec III		t02
02.11.2006	Katze	Nasentupfer	A	A1	SCCmec III		t02
05.12.2006	Hund	Wundtupfer	A	A8	SCCmec III	ST71	t02
27.12.2006	Hund	Wundtupfer	A	A4	SCCmec III		t02
14.05.2007	Hund	Wundtupfer	A	A8	SCCmec III	ST71	t02
30.05.2007	Hund	Wundsekret	A	A12	SCCmec III	ST71	t02
14.06.2007	Hund	Wundtupfer	A	A1	SCCmec III	ST71	t02
18.06.2007	Hund	Wundtupfer	A	A1	SCCmec III		t02
20.06.2007	Hund	Wundtupfer	A	A1	SCCmec III		t02
25.06.2007	Hund	Harn	A	A7	SCCmec III		t02
10.08.2007	Katze	Harn	A	A4	SCCmec III		t02
20.08.2007	Hund	Ohrtupfer	D	D1	SCCmec III	ST71	t02
04.09.2007	Hund	Ohrtupfer	A	A7	SCCmec III		t02
06.09.2007	Hund	Abszeßtupfer	A	A7	SCCmec III		t02
24.09.2007	Katze A	Ohrtupfer	A	A8	SCCmec III		t02
24.09.2007	Katze A	Ohrtupfer	A	A8	SCCmec III		t02
01.10.2007	Katze	Harn	A	A7	SCCmec III		t02
07.11.2007	Hund	Ohrtupfer	A	A7	SCCmec III		t02
26.02.2008	Hund	Wundtupfer	C	C2	SCCmec III	ST71	t06
27.05.2008	Hund	Wundtupfer	A	A10	SCCmec III	ST71	t05
02.07.2008	Hund A	Wundtupfer	A	A10	SCCmec III		t05
24.07.2008	Hund A	Wundtupfer	A	A10	SCCmec III		t05

Da aus dieser Klinik über einen längeren Zeitraum (vier Jahre) die meisten MRSP (n=31) aus eingesandtem Untersuchungsmaterial isoliert wurden, lassen sich hier auch einige zumindest auffällige Verbindungen zwischen einzelnen Isolaten erkennen.

Zwei MRSP desselben PFGE-Subtyps (A2) wurden am selben Tag (08.06.05) aus Wundinfektionen verschiedener Hunde eingesandt, was eine epidemische Assoziation dieser MRSP zumindest vermutbar macht. Auch drei weitere Cluster von zeitlich nahe liegenden Einsendungen identischer MRSP-Subtypen sind auffällig: im Abstand von 1 bis 2 Tagen (31.10. bis 02.11.06) wurden identische PFGE-Subtypen (A1) aus Wundinfektionen zweier Hunde und dem Nasensekret einer Katze eingesandt. Ein weiteres Isolat dieses Subtyps wurde bereits 17 Tage zuvor aus Probenmaterial eines anderen Hundes eingesandt.

Innerhalb von insgesamt sechs Tagen (14.06. bis 20.06.07) wurden drei MRSP desselben PFGE-Subtyps (A1) von verschiedenen Hunden mit Wundheilungsstörungen isoliert.

Zwei MRSP des PFGE-Subtyps A7 wurden innerhalb von zwei Tagen (04. und 06.09.07) aus Probenmaterial verschiedener Hunde eingesandt.

Mehrfach wurden jedoch auch innerhalb eines Monats MRSP verschiedener PFGE-Subtypen isoliert (05/ 2007: A8 und A12; 08/ 2007: A1 und D4; 12/ 2006: A4 und A8), daher ist auch vielfach von Autoinfektionen auszugehen, die z.B. auf unbemerkter Kolonisation des Tieres oder Selektion resistenter Varianten infolge von antimikrobieller Therapie beruhen. Ein großer Teil der aus dieser Klinik untersuchten MRSP-Isolate stammt aus Wundtupfern, so dass es sich also auch im Falle von Autoinfektionen durchaus um nosokomiale Infektion infolge von z.B. Operationen oder invasiven Manipulationen in der Klinik handeln könnte.

**Tabelle 7: Klinik B**

**8 MRSP: Datum der Einsendung, Tierart, Art des Probenmaterials, Ergebnisse der molekularen Typisierung**

Datum der Einsendung	Tierart	Probenmaterial	PFGE Cluster	PFGE Subtyp	SCCmec Element	Sequenz Typ	spa-Typ
09.05.2007	Pferd	Kot	A	A5	SCCmec III		t02
18.05.2007	Esel	Kot	A	A5	SCCmec III		t02
21.08.2007	Pferd	Wundtupfer	A	A5	SCCmec III		t02
28.08.2007	Pferd	Wundsekret	B	B2	SCCmec III		t02
17.09.2007	Pferd	Wundtupfer	A	A5	SCCmec III		t02
25.09.2007	Pferd	Wundtupfer	A	A5	SCCmec III	ST71	t02
26.02.2008	Pferd	Nasentupfer	A	A1	SCCmec III		t02
05.03.2008	Pferd	Wundtupfer	B	B2	SCCmec III		t02

Innerhalb von neun Tagen (09.05.07 und 18.05.07) wurden zwei MRSP mit identischen Makrorestriktionsmustern (A5) bei verschiedenen Patienten der Klinik isoliert, allerdings in beiden Fällen aus Kotproben, also aus für *S. pseudintermedius* nicht typischen Habitaten. Auch

sind nosokomiale Infektionen des Gastrointestinaltrakts bei Pferden verursacht durch MRSP in der Literatur nicht beschrieben, was als ein Hinweis darauf gedeutet werden könnte, dass es sich hier ebenso gut um Begleitmikrobiota handeln kann, die mit der eigentlich Infektion nicht im Zusammenhang steht .

Zwei weitere Stämme desselben Subtyps (A5) sind innerhalb von acht Tagen (17. und 25. 09.07) aus Wundtupfern zweier Pferde isoliert worden, was einen nosokomialen Zusammenhang und eine ursächliche Beteiligung von MRSP an den Wundheilungsstörungen zumindest denkbar macht. Auch in dieser Klinik sind jedoch in engen Zeiträumen (neun Tage bzw. sieben Tage) Stämme aus unterschiedlichen PFGE-Subtypen und Clustern isoliert worden, was auch hier eher für Autoinfektionen der jeweiligen Tiere sprechen könnte.

**Tabelle 8: Klinik C**

**13 MRSP: Datum der Einsendung, Tierart, Art des Probenmaterials, Ergebnisse der molekularen Typisierung**

Datum der Einsendung	Tierart	Probenmaterial	PFGE Cluster	PFGE Subtyp	SCCmec Element	Sequenz Typ	spa-Typ
27.07.2006	Hund	OP-Tupfer	A	A13	SCCmec III	ST71	t02
07.11.2006	Hund	Harn	A	A1	SCCmec III		t02
18.11.2006	Hund	Hauttupfer	A	A6	SCCmec III		t02
22.11.2006	Hund	Wundtupfer	A	A7	SCCmec III		t02
21.12.2006	Hund	Augentupfer	A	A6	SCCmec III	ST71	t02
20.01.2007	Hund	OP-Tupfer	A	A7	SCCmec III		t02
13.03.2007	Hund	Wundtupfer	A	A11	SCCmec III	ST71	t02
14.03.2007	Hund	Wundtupfer	A	A7	SCCmec III		t02
18.03.2007	Hund	Wundtupfer	A	A1	SCCmec III		t02
17.04.2007	Hund	OP-Tupfer	A	A6	SCCmec III		t02
06.07.2007	Katze	Wundtupfer	A	A7	SCCmec III		t02
24.07.2007	Hund	OP-Tupfer	A	A2	SCCmec III		t02
13.10.2007	Hund	OP-Tupfer	A	A7	SCCmec III		t02

Obwohl alle MRSP-Isolate dieser Klinik demselben PFGE-Cluster (A) zuzuordnen sind, zeigt sich eine gewisse Diversität zwischen den verschiedenen PFGE-Subtypen, die keine eindeutigen Verbindungen zwischen verschiedenen Isolaten erkennen lässt. Die Isolate, die demselben Subtyp zuzuordnen sind (z.B. fünf MRSP vom Typ A7) sind mit relativ großen Zeitabständen (mehrere Monate) isoliert worden, was eine direkte Verbindung der Stämme im Sinne eines Ausbruchs unsicher erscheinen lässt. Dennoch stammen diese Isolate aus Probenmaterial (Wund- und intraoperative Tupfer), das auf nosokomiale Infektionen einzelner Tiere im Zusammenhang mit chirurgischen Eingriffen in der Klinik deuten kann, auch wenn kein direkter Ausbruch daraus geschlossen werden kann.

**Tabelle 9: Klinik D**

**3 MRSP: Datum der Einsendung, Tierart, Art des Probenmaterials, Ergebnisse der molekularen Typisierung**

Datum der Einsendung	Tierart	Probenmaterial	PFGE Cluster	PFGE Subtyp	SCCmec Element	Sequenz Typ	spa-Typ
04.06.2007	Hund	Ohrtpfer	A	A1	SCCmec III		t02
02.10.2007	Hund	Ohrtpfer	A	A6	SCCmec III	ST71	t02
29.10.2007	Fleischfresser	Ohrtpfer	A	A7	SCCmec III		t02

Auch in dieser Klinik gehören alle isolierten MRSP zum PFGE-Cluster A, jedoch gehören alle drei Isolate auch unterschiedlichen Subtypen an. Die Art des eingesandten Probenmaterials (Ohrtpfer) lässt zunächst keinen direkten Zusammenhang zu einem nosokomialen Infektionsgeschehen vermuten.

**Tabelle 10: Klinik E**

**4 MRSP: Datum der Einsendung, Tierart, Art des Probenmaterials, Ergebnisse der molekularen Typisierung**

Datum der Einsendung	Tierart	Probenmaterial	PFGE Cluster	PFGE Subtyp	SCCmec Element	Sequenz Typ	spa-Typ
26.03.2008	Hund A	Wundtupfer	B	B1	SCCmec III		t02
08.04.2008	Hund A	Wundtupfer	B	B1	SCCmec III	ST71	t02
17.04.2008	Katze	Wundtupfer	B	B1	SCCmec III	ST71	t02
23.04.2008	Katze	Harn	B	B1	SCCmec III		t02

Nicht nur die identischen Typisierungsergebnisse der Isolate (identisches Makrorestriktionsmuster), sondern auch die zeitliche Nähe ihrer Einsendung (Einsendung innerhalb von max. 15 Tagen, im jeweiligem Abstand von 9 bzw. 6 Tagen) lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den Isolaten dieser Klinik um einen nosokomialen Ausbruch handeln könnte.

**Tabelle 11: Klinik F**
**2 MRSP: Datum der Einsendung, Tierart, Art des Probenmaterials, Ergebnisse der molekularen Typisierung**

Datum der Einsendung	Tierart	Probenmaterial	PFGE-Cluster	PFGE Subtyp	SCCmec Element	Sequenz Typ	spa-Typ
22.04.2008	Katze	Wundtupfer	A	A1	SCCmecIII	ST71	t02
02.05.2008	Hund	OP-Tupfer	A	A3	SCCmecIII		t02

**Tabelle 12: Klinik G**
**2 MRSP: Datum der Einsendung, Tierart, Art des Probenmaterials, Ergebnisse der molekularen Typisierung**

Datum der Einsendung	Tierart	Probenmaterial	PFGE-Cluster	PFGE Subtyp	SCCmec Element	Sequenz-Typ	spa-Typ
07.04.2008	Katze	Harn	A	A3	SCCmec III	ST71	t02
24.04.2008	Hund	Gelenktupfer	A	A6	SCCmec III		t02

Zwar sind in beiden Kliniken jeweils MRSP desselben PFGE-Clusters (A) in engen Zeitabständen von 10 bzw. 17 Tagen aus verschiedenen Patienten isoliert worden, da es sich aber um verschiedene PFGE-Subtypen handelt, sind direkte Verbindungen in den einzelnen Kliniken nicht nahe liegend. Dennoch könnte speziell die Art des eingesandten Probenmaterials in Klinik F (OP- und Wundtupfer) einen Hinweis auf Autoinfektionen, die sich infolge von chirurgischen Eingriffen manifestiert haben könnten, geben.

**Tabelle 13: Klinik H**
**4 MRSP: Datum der Einsendung, Tierart, Art des Probenmaterials, Ergebnisse der molekularen Typisierung**

Datum der Einsendung	Tierart	Probenmaterial	PFGE Cluster	PFGE Subtyp	SCCmec Element	Sequenz Typ	spa-Typ
28.03.2008	Hund	Wundtupfer	B	B3	NT	ST71	NT
18.04.2008	Hund	Wundtupfer	A	A9	SCCmec III	ST71	t02
29.04.2008	Hund	Wundtupfer	A	A1	SCCmec III	ST71	t02
07.05.2008	Hund	Wundtupfer	A	A1	SCCmec III		t02

Alle aus dieser Klinik stammenden MRSP sind aus Wundinfektionen von verschiedenen Hunden isoliert worden. Zwei der Isolate gehören demselben PFGE Subtyp (A1) an und sind im Abstand von acht Tagen eingesandt worden, was eine Transmission zwischen den beiden Tieren möglich macht.

#### 4.1.4 MRSP aus Tierarztpraxen

**Tabelle 14: Praxis A**

### 3 MRSP: Datum der Einsendung, Tierart, Art des Probenmaterials, Ergebnisse der molekularen Typisierung

Datum der Einsendung	Tierart	Probenmaterial	PFGE Cluster	PFGE Subtyp	SCCmec Element	Sequenz Typ	spa-Typ
30.04.2007	Hund	Wundtupfer	A	A4	SCCmec III		t02
21.05.2007	Hund	Wundtupfer	A	A1	SCCmec III		t02
29.09.2007	Hund	Hauttupfer	B	B5	SCCmec III	ST71	t02

Die drei MRSP-Isolate, die aus derselben Tierarztpraxis stammen, zeigen drei unterschiedliche PFGE-Bandenmuster (zwei Cluster; verschiedene Subtypen). Die beiden MRSP des Clusters A sind zwar in zeitlicher Nähe aus Wundtupfern isoliert worden; dennoch gehören sie zu verschiedenen Subtypen des Clusters A und lassen somit keinen direkten Zusammenhang erkennen.

## 4.2 Resistenztestung gegenüber $\beta$ -Lactam Antiinfektiva

Für alle 146 MRSP Isolate wurden mithilfe des Mikrodilutionsverfahrens im automatisierten BD Phoenix System minimale Hemmstoffkonzentrationen (MHK) auch für  $\beta$ -Lactam-basierte antimikrobielle Wirkstoffe bestimmt. Berücksichtigt wurden hierbei neben klassischen  $\beta$ -Lactamen auch  $\beta$ -Lactamase-feste Wirkstoffgruppen wie Cephalosporine (Cefoxitin) und Carbapeneme (Imipenem und Meropenem). Insbesondere Cefoxitin wird in der Human- und Veterinärmedizin häufig als Testagenz zum Nachweis der Methicillin-Resistenz bei *S. aureus* verwendet und ist daher auch für die MRSP dieser Arbeit von besonderem Interesse.

Die Ergebnisse der MHK-Testung aller 146 Isolate für  $\beta$ -Lactame sind in Tabelle 15 dargestellt.

Die Testung erfolgte mit klinischen Grenzwerten (Breakpoints) und Wirkstoffkonzentrationen entsprechend internationaler Standards nach CLSI (M100-S17; M31-S1) im automatisierten BD Phoenix System.

**Tabelle 15:**

### MHK-Testung aller 146 MRSP-Isolate gegenüber $\beta$ -Lactam basierten Antiinfektiva

Wirkstoff	MHK-Spanne $\mu\text{g/ml}$	Resistenzphänotyp				Bewertung entsprechend CLSI <sup>1</sup>		
		resistent	(%)	intermediär	(%)	sensibel	(%)	
Ampicillin	>1	146	100	0	0	0	0	R
Ampicillin/Sulbactam	$\leq 4/2$ - > 16/8	4	2,7	118	80,8	24	16,4	R
Cefoxitin	$\leq 2$ - > 16	38	26	0	0	108	74	R
Imipenem	$\leq 2$ - 8	10	6,8	2	1,4	134	91,8	R
Meropenem	$\leq 2$ - > 8	56	38,4	11	7,5	79	54,1	R
Penicillin	$\geq 0,25$	146	100	0	0	0	0	R
Oxacillin	>2	145	99,3	0	0	1	0,7	R

Abkürzungen: R, resistent; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute

<sup>1</sup> unabhängig vom Resistenzphänotyp sind *mecA*-positive Isolate entsprechend CLSI (M31-A3, vol. 28, 2008) als resistent gegenüber allen  $\beta$ -Lactamen einzustufen

Obwohl bei allen 146 MRSP dieser Arbeit das Methicillin-Resistenz vermittelnde Gen *mecA* PCR-basiert nachgewiesen wurde und weiterhin das *mecA*-enthaltende genetische Element *SCCmec* für alle MRSP typisiert wurde, zeigen sich in der phänotypischen Resistenztestung gegenüber  $\beta$ -Lactam-basierenden Antiinfektiva heterogene Ergebnisse. Besonders gegenüber den  $\beta$ -Lactamase-festen Wirkstoffen Cefoxitin, Imipenem und Meropenem zeigen sich die meisten MRSP phänotypisch sensibel, obwohl sie aufgrund des *SCCmec*-Elements *in vivo* als resistent zu bewerten sind.

Nur gegenüber Ampicillin und Penicillin zeigen sich alle untersuchten Isolate phänotypisch resistent.

## 5 Diskussion

Ziel dieser kumulativen Arbeit ist es, die Bedeutung animaler MRSP als Infektionserreger in der tiermedizinischen Praxis und im nosokomialen Zusammenhang zu beleuchten und mithilfe molekularer Typisierung einen Einblick in die Verwandtschaft der Isolate zu erhalten.

Die zuverlässige routinemäßige Speziesidentifizierung von *S. pseudintermedius* ist dabei nicht nur von epidemiologischem, sondern auch von klinischem Interesse. Basierend auf empirischen Daten zu biochemischen und phänotypischen Charakteristika der drei SIG-Spezies [116, 237], wurde zur Differenzierung von *S. pseudintermedius* innerhalb der SIG in dieser Arbeit die enzymatische Aktivität von Arginindihydrolase (ADH) und DNase getestet. Da alle 146 Isolate positive Testergebnisse, sowohl für die enzymatische Aktivität von ADH als auch für die der DNase zeigen, wurden sie phänotypisch zunächst als *S. pseudintermedius* identifiziert, und dies durch DNA-Sequenzabgleiche definierter *housekeeping*-Gene mit in der NCBI GenBank hinterlegten DNA-Sequenzen von *S. pseudintermedius* bestätigt. Die Testung der enzymatischen Aktivität von ADH und DNase scheint damit ein sinnvolles, praktikables und nicht zu kostenintensives Verfahren zu sein, das sich auch für die Routinediagnostik eignet.

Bes et al. haben 2002, also wenige Jahre vor der ersten Beschreibung von *S. pseudintermedius*, in einer Studie zur Populationsdiversität von *S. intermedius* gezeigt, dass vermeintliche *S. intermedius* Isolate von Tauben kaum bzw. äußerst selten ADH produzieren [114]. Im Jahr 2007, wurde dann in einer japanischen Studie durch DNA-Sequenzanalysen belegt, dass Isolate der SIG von Tauben häufig tatsächlich zur Spezies *S. intermedius* gehören, während SIG-Isolate von Hunden, Katzen und Menschen vornehmlich *S. pseudintermedius* zuzuordnen sind [117]. Da sich *S. intermedius* negativ für ADH zeigt, kann diese Beobachtung als ein Hinweis darauf gedeutet werden, dass auch in diesem Fall die Testung von ADH zur Differenzierung zwischen *S. intermedius* und *S. pseudintermedius* zuverlässig war. Sasaki et al. konnten bei der Klassifizierung der im Jahr 2007 untersuchten SIG-Isolate von verschiedenen Wirten zeigen, dass 100% der genotypisch identifizierten *S. pseudintermedius* positive Testergebnisse für ADH lieferten, während 0% der genotypisch nachgewiesenen *S. intermedius* ADH produzierten [117]. Diese Stämme wurden alle ursprünglich mithilfe des ID32Staph System (Biomérieux) als *S. intermedius* identifiziert.

Ein standardisiertes Verfahren für den Speziesnachweis von *S. pseudintermedius* ebenso wie für den Nachweis der Methicillin-Resistenz ist nicht nur für die Routinediagnostik, sondern auch zur Vereinheitlichung von Erfassungs- und Surveillanceprogrammen für MRSP sinnvoll und wichtig. Nur so kann die Bedeutung von MRSP als nosokomialer Problemkeim langfristig erkannt und beurteilt werden bzw. können Maßnahmen zur Prävention gezielt entwickelt werden. Zukünftige Studien sollten daher insbesondere Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität phänotypischer Testverfahren zur Differenzierung der Spezies innerhalb der SIG beinhalten.

Die Tatsache, dass alle in dieser Arbeit untersuchten Methicillin-resistenten Staphylokokken der intermedius Gruppe (MRSIG) phäno- und genotypisch eindeutig als *S. pseudintermedius* identifiziert wurden, stützt die Vermutungen früherer Studien, dass *S. pseudintermedius* eine größere klinische Bedeutung hat als *S. intermedius* und *S. delphini* und insbesondere die Bedeutung von *S. intermedius* aufgrund von Missidentifizierungen in der Vergangenheit falsch eingeschätzt wurde [117, 118, 238].

Die Daten zur tierartlichen Verteilung von MRSP aus beiden Publikationen zeigen, dass MRSP insbesondere bei Hunden und Katzen häufig aus klinischen Proben zu isolieren sind, aber auch MRSP von Pferden, einem Esel und einem Papagei sind in dieser Arbeit identifiziert worden. Auch die vier Typstämme, die im Rahmen der Speziesidentifizierung von *S. pseudintermedius* 2005 von Devriese et al. hinterlegt wurden, sind von Hund, Katze, Pferd und einem Papagei isoliert worden [116], was ein breiteres Wirtsspektrum von *S. pseudintermedius* vermuten lässt.

Vergleichende Aussagen zu (Prävalenz-)Studien von MRSP, die sich durch verschiedene Studiendesigns sowie oftmals unterschiedliche diagnostische Methoden unterscheiden, sind jedoch nur sehr eingeschränkt oder überhaupt nicht möglich. Dies ist bei MRSP insbesondere dadurch erschwert, dass der rein phänotypische Nachweis der Methicillin-Resistenz (z.B. durch Resistenztestungen gegenüber Cefoxitin) vielfach zu falsch negativen Ergebnissen und damit zu einer zu geringen Prävalenz der Methicillin-Resistenz führt [239, 240]. Bei Vergleichen mit anderen Studien muss also nicht nur die unterschiedliche Zusammensetzung der Studienpopulation (handelt es sich z.B. um Stichproben von gesunden Tieren, nur um bestimmte Tierarten bzw. Vorberichte, klinische Isolate etc.), sondern auch das jeweilige Nachweisverfahren der Methicillin-Resistenz berücksichtigt werden, da dies unter Umständen zu erheblichen Verzerrungen führen kann. Eine kürzlich veröffentlichte Studie hat eine unerwartet hohe Prävalenz (16,7%) von MRS(P)I auch bei klinisch gesunden Hunden festgestellt [241], hier wurde allerdings eine relativ kleine Anzahl von Hunden (36) systematisch mit phänotypischen Methoden auf MRS getestet. Eine andere Studie hat eine Prävalenz von 6,5% MRS(P)I bei insgesamt 61 untersuchten gesunden Hunden festgestellt, nachdem aus Nase, Maulhöhle oder der Haut Tupferproben genommen und PCR-basiert auf Methicillin resistente Staphylokokken untersucht wurden [242]. Bei 90 Staphylokokken-Isolaten von Hunden mit dem spezifischen Vorbericht Pyodermie, die retrospektiv hinsichtlich Methicillin-Resistenz und Spezies untersucht wurden, fanden sich in einer weiteren Studie aus dem Jahr 2004 mithilfe phänotypischer Nachweismethoden nur 2 MRS(P)I, während ein anschließender PCR-basierter *mecA*-Nachweis 22 weitere MRS(P)I identifizierte [243]. Eine größer angelegte Studie aus dem Jahr 2006 hat klinische Isolate einer Tierklinik über einen Zeitraum von 24 Monaten auf MRS untersucht und eine MRS(P)I Häufigkeit von 0,3% für Hunde und 0,02% für Katzen ermittelt [244]. Diese Studie hat zwar, zumindest was den Umfang und die Zusammensetzung des Probenkonvoluts betrifft, die größten Gemeinsamkeiten mit der vorliegenden Arbeit, allerdings wurde die Methicillin-

Resistenz hier ausschließlich phänotypisch im Agardiffusionsverfahren getestet und nicht PCR-basiert, was einen direkten Vergleich der Daten wiederum erschwert.

Im Rahmen dieser Arbeit ist keine repräsentative Stichprobe zur Erhebung der Prävalenz von MRSP erfolgt, sondern vielmehr eine retrospektive Untersuchung und molekulargenetische Typisierung von klinischen Isolaten, die im Verlaufe von mehreren Jahren in der routinemäßigen Diagnostik verschiedener Labore eingegangen sind. Dies schränkt die epidemiologische Aussagekraft der Studie zwar einerseits ein, gibt aber andererseits dennoch einen realistischen Eindruck von der klinischen Bedeutung dieses Erregers wieder.

Der größte Anteil von MRSP dieser Arbeit wurde aus infizierten Wunden isoliert (45,21%), speziell bei MRSP aus klinischen Einrichtungen stammen sogar 52% der Isolate aus Wundtupfern. Obwohl eine vollkommene Differenzierung zwischen Infektion und Kolonisation durch die isolierte Bakterienspezies nicht gewährleistet sein kann, ist dennoch zu vermuten, dass MRSP hier häufig auch ursächlich an den Wundinfektionen beteiligt sind. Auch andere Studien identifizierten MRSP(I) immer wieder als Erreger von Wundinfektionen [48, 118, 157, 228].

Bei Isolaten aus klinischen Einrichtungen muss berücksichtigt werden, dass ein Teil der Patienten bei Vorstellung in der Klinik bereits vom Haustierarzt antherapiert bzw. antimikrobiell vorbehandelt sein könnte, und somit unter Umständen bereits eine Selektion resistenter Varianten (wie z.B. MRSP) auf bzw. in dem Tier stattgefunden hat. MRSP können damit als potentielle endogene Erreger, die das Tier möglicherweise bei Vorstellung in der Klinik bereits mitbringt, ein Risiko für eine Infektion darstellen. Aufgrund ihrer Fähigkeit lange Zeit auf Oberflächen und Gegenständen infektiösfähig zu bleiben, können MRSP jedoch auch zur sekundär endogenen oder exogenen Infektionsquelle für andere Klinikpatienten werden und über verschiedenste Vektoren zwischen ihnen übertragen werden. Boerlin et al. haben im Jahr 2001 für *S. (pseud)intermedius* Isolate aus postoperativen Wundinfektionen bei Hunden in einer Tierklinik mithilfe von Makrorestriktionsanalysen für jeden Hund einen anderen Stamm identifizieren können. Dies hat zu der Vermutung geführt, dass es sich um endogene Infektionen mit Bestandteilen der eigenen Hautmikrobiota handelte und keine Übertragung zwischen Patienten innerhalb der Klinik stattfand [41]. Weitere Bestärkung fand dieses Argument in der Tatsache, dass auch intensivierete Reinigung und Desinfektion der Klinikräume und Stationen keinen erkennbaren Einfluss auf die Häufigkeit der *S. (pseud)intermedius* Infektionen nahm. Dies bestärkte die Vermutung der Autoren, es handle sich nicht um eine Infektionsquelle in der Umgebung der Patienten, sondern um Fälle von Autoinfektionen, die in keinem Zusammenhang zueinander stehen. Die teilweise hohe Prävalenz von *S. pseudintermedius* bei Hunden sowie ihre Umweltresistenz machen eine Verbreitung sowohl von MSSP als auch von MRSP in Tierkliniken und Tierarztpraxen jedoch sehr wahrscheinlich. Solange die Prävalenzen von MRSP in nur wenigen Studien mit unterschiedlicher Methodik erfasst werden, bleiben vergleichende Aussagen und letztlich valide Bewertungen über die Prävalenz und nosokomiale Bedeutung von MRSP im Bereich von Mutmaßungen. Valide Daten über die genaue Prävalenz von MRSP bei verschiedenen Tierarten bzw. Indikationen können erst

durch multizentrische Studien erreicht werden, die in verschiedenen Tierkliniken (beispielsweise aus jedem deutschen Bundesland eine teilnehmende Kleintierklinik) nach einheitlichem Verfahren repräsentative Stichproben untersuchen.

Systematische Infektions-Kontroll-Programme, deren Kern eine gezielte Surveillance darstellt, fehlen in der Tiermedizin bislang und sind dringend erforderlich um die Epidemiologie multiresistenter Erreger nachvollziehen und sinnvolle Präventionsmaßnahmen entwickeln zu können. In der Humanmedizin ist durch §23 des Infektionsschutzgesetzes klar geregelt, dass Kliniken und Einrichtungen für ambulantes Operieren eine Surveillance für bestimmte nosokomiale Infektionen und Erreger mit speziellen Resistenzen oder Multiresistenzen durchführen müssen und die erhobenen Daten fortlaufend aufzuzeichnen und zu bewerten sind.

Grundlage einer erfolgreichen Surveillance ist ein Qualitätsmanagement, das einheitliche Definitionen nosokomialer Infektionen sowie einheitliche diagnostische Methoden der Erfassung und Auswertung gewährleistet. Dies ist bislang insbesondere für MRSP in der Tiermedizin nicht gegeben und sollte entsprechend den jüngsten Erkenntnissen zur Resistenztestung und zum Speziesnachweis standardisiert werden. Speziell die Methicillin-Resistenz sollte in zukünftigen, multizentrischen Studien einheitlich PCR-basiert durch den Nachweis von *mecA* erfolgen.

Während in der Humanmedizin große Unterschiede in der Patientenpopulation einzelner Klinikstationen eine Stratifizierung und Standardisierung der Daten erforderlich machen, ermöglicht die vergleichsweise einfache Struktur der meisten Tierkliniken und Tierarztpraxen eine Konzentration auf wenige wesentliche Kernbereiche. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass MRSP insbesondere bei Hunden mit der Indikation Wundinfektion eine Rolle spielen können. Hier kann also z.B. bei planbaren Operationen schon im Vorfeld eine gezielte Testung mittels Nasen- und/oder Hauttupfer erfolgen, andernfalls können systematisch Tupferproben aus (Operations-) Wunden auf MRS untersucht werden. Eine amerikanische Studie zur Surveillance nosokomialer Infektionen konnte spezielle Risikofaktoren für deren Vorkommen bei Hunden in einer Tierklinik bestimmen. Genannt wurden insbesondere eine antibiotische Vorbehandlung innerhalb der letzten 30 Tage, ein chirurgischer Eingriff innerhalb der letzten 30 Tage, die Aufnahme auf die Intensivstation sowie die Vorstellung bei einer überweisenden Tierarztpraxis bzw. Tierklinik innerhalb der letzten 30 Tage [245]. In Anlehnung an diese Ergebnisse könnten Surveillanceprogramme bei Hunden ein systematisches Screening auf multiresistente Erreger beim Vorhandensein eines oder mehrerer dieser Risikofaktoren beinhalten.

Die Surveillance sollte zudem nicht nur das Auftreten bestimmter Bakterien berücksichtigen, sondern auch eine systematische Infektionskontrolle beinhalten. In jeder größeren klinischen Einrichtungen können Infektions-Kontroll-Personen bzw. Hygienebeauftragte das Auftreten bestimmter Infektionen (z.B. Wundinfektionen, Septitiden) zentral erfassen und auswerten, damit frühzeitig ein vermehrtes Auftreten z.B. in bestimmten Abteilungen, bei bestimmten Operationstechniken, bestimmten Prozeduren oder bestimmten Chirurgen erkannt wird. Dies

ermöglicht auch ein frühzeitiges Erkennen von nosokomialen Ausbrüchen bzw. deren Vorstufen und damit ein schnelles und gezieltes Reagieren.

Im Zusammenhang mit der nosokomialen Bedeutung von MRSP stellt sich auch die Frage nach der Bedeutung von (transient) besiedeltem Klinikpersonal. Boerlin et al. stellten zur Diskussion, dass der Mensch natürlicherweise nur selten mit *S. (pseud)intermedius* kolonisiert ist und somit das Klinikpersonal womöglich nicht im selben Umfang als Infektionsquelle für die Patienten betrachtet werden muss wie bei *S. aureus*. Obwohl sicherlich *S. aureus* und auch MRSA im Gegensatz zu MRSP bei Menschen physiologischer Bestandteil der gesunden Hautmikrobiota sein können, muss berücksichtigt werden, dass transiente *S. pseudintermedius*-Besiedlungen, auch durch multiresistente Stämme, bei Menschen, die häufigem Kontakt zu Hunden ausgesetzt sind, bereits mehrfach beschrieben wurden [136, 143]. Auch eine (transiente) Kolonisation von Tierärzten, Studenten und Klinikpersonal ist daher wahrscheinlich und wurde in einigen Studien bereits belegt [237, 246, 247]. Eine kürzlich erschienene Studie hat gezielt Hunde- und Katzenbesitzer sowie die in ihrem Haushalt lebenden Tiere auf Koagulase-positive Staphylokokken untersucht und in den Tierbesitzern eine *S. pseudintermedius* Prävalenz von 4,1% ermittelt, darunter fand sich auch ein Methicillin-resistentes Isolat [134]. Makrorestriktionsanalysen konnten identische *S. pseudintermedius* Isolate von den kolonisierten Hundebesitzern und ihren Hunden in insgesamt vier von neun Haushalten nachweisen. Knapp die Hälfte der getesteten Tierbesitzer (42,5%) übte eine berufliche Tätigkeit im veterinärmedizinischen Bereich aus, was damit zwar eine generelle Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Allgemeinbevölkerung einschränkt, jedoch die Bedeutung des kolonisierten Klinikpersonals bei der Verbreitung von nosokomialen Infektionen unterstreicht.

MRSP derselben klonalen Gruppe (entsprechend der PFGE-Analyse) konnten auch bei verschiedenen Hunden sowie einem Mitarbeiter einer Universitäts-Tierklinik in Japan identifiziert werden [237]. In einer niederländischen Kleintierklinik wurden im Jahr 2008 Chirurgen, Angestellte, Einrichtungsgegenstände und die Hunde von Klinikangestellten auf MRS(P)I getestet, nachdem bei mehreren Tieren innerhalb weniger Tage MRS(P)I aus postoperativen Wundinfektionen isoliert wurden. Identische PFGE-Makrorestriktionsmuster von MRS(P)I aus der Nase des Chirurgen, mehreren Angestellten, den Klinikräumlichkeiten, dem Hund eines Angestellten sowie den Wundinfektionen erkrankter Patienten legten nahe, dass die Ursache der postoperativen Wundinfektionen möglicherweise in der Besiedelung des Chirurgen und der anderen positiv getesteten Angestellten zu suchen ist, da diese während der Operationen anwesend waren und die erkrankten Tiere keinen direkten Kontakt zueinander hatten [247].

Tierärzte, Klinikpersonal und tiermedizinische Studenten müssen sich daher bewusst machen, dass sie bei häufigem Kontakt zu Hunden, besonders im Umfeld von klinischen Einrichtungen, mit multiresistenten *S. pseudintermedius* besiedelt sein können, und so möglicherweise eine Infektionsquelle für animale Patienten darstellen. Auch die Tierbesitzer, insbesondere von Hunden mit *S. pseudintermedius*-bedingten Pyodermien, können transient

mit demselben Stamm wie ihr Hund besiedelt sein [134, 143]. Gerade im Zusammenhang mit der caninen Pyodermie, die sich nicht selten durch protrahierten und langwierigen Krankheitsverlauf auszeichnet, könnte die asymptomatische Besiedelung des Hundebesitzers möglicherweise die Quelle einer rekurrenten Infektion des Hundes nach zunächst erfolgreicher Antibiose sein. Durch wiederholten und verlängerten Antibiotika-Einsatz kann dann wiederum die Entwicklung resistenter- und multiresistenter Stämme gefördert werden. Weitere valide Untersuchungen zur wechselseitigen Übertragung von Methicillin-resistenten Staphylokokken, insbesondere von MRSP zwischen Mensch und Tier, sind dringend erforderlich.

Zur Untersuchung und Aufklärung nosokomialer Ausbrüche in klinischen Einrichtungen der Human- und Tiermedizin findet häufig die Makrorestriktionsanalyse mittels PFGE, die als sehr diskriminative Typisierungsmethode gilt, Verwendung [11, 209, 248]. Dies ist insbesondere bei Isolaten, die in zeitlich engem Zusammenhang von verschiedenen Patienten einer Klinik isoliert werden, aussagkräftig und sinnvoll, und beispielsweise bei MRSA zur Identifizierung von Ausbruchstämmen als geeignetes Verfahren etabliert [209]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PFGE nicht primär zur Untersuchung nosokomialer Ausbrüche herangezogen, sondern als ergänzende Typisierungsmethode einer Vielzahl von Isolaten, die über einen Zeitraum von mehreren Jahren aus verschiedenen Regionen gesammelt wurden. Bei der Auswertung der Typisierungsergebnisse zeigte sich jedoch, dass in einigen Kliniken (A, B, E und H) identische PFGE-Subtypen in kurzen Abständen aus verschiedenen Tieren isoliert wurden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Isolate auch in einem epidemiologischen Zusammenhang stehen könnten und MRSP als nosokomiale Infektionserreger in der Kleintier- und teilweise auch in der Pferdepraxis eine Rolle spielen könnten. Dennoch kann dies nur als ein Hinweis gewertet werden, da keine direkte epidemiologische Untersuchung in den jeweiligen Kliniken oder dem Umfeld der Patienten erfolgt ist. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass sich bei den 146 Isolaten dieser Arbeit mittels PFGE generell eine geringe Diversität zeigt. Die Isolate verteilen sich auf nur 25 verschiedene PFGE-Subtypen, wobei der Subtyp A-1 die Sammlung deutlich dominiert. Hier finden sich Isolate verschiedenener Tierarten, aus verschiedenen geografischen Regionen und auch verschiedene *spa*-Typen (siehe Publikation 2). Ähnliche Ergebnisse haben auch frühere Studien zeigen können. Loeffler et al. haben 2007 ebenfalls in zwölf untersuchten MRSP identische *SmaI*-Bandenmuster von Tieren, die in keiner geografischen Verbindung zueinander stehen, identifizieren können [249]. Auch Moodley et al. fanden in MRSP aus Schweden, Deutschland und den USA jeweils identische *SmaI*-Bandenmuster, allerdings wurden hier insgesamt nur wenige Isolate untersucht [157]. In zehn MRS(P)I, die in einer deutschen Studie aus dem Jahr 2006 innerhalb einiger Monate aus einer Klinik isoliert wurden, konnten ebenfalls identische bzw. nah verwandte *SmaI*-Bandenmuster gefunden werden [48]. Obwohl bislang nur wenige vergleichende Studien mit größeren Stammkollektiven über *SmaI*-Makrorestriktionsanalysen von MSSP und MRSP verfügbar sind, konnten auch andere Publikationen zeigen, dass Methicillin-resistente Isolate große

Homologien zeigen und sich meist in wenige, nah verwandte Cluster aufteilen. Insbesondere der Vergleich zu *mecA*-negativen Isolaten zeigt mittels PFGE eine vergleichsweise geringe Diversität [203, 250]. Black et al. konnten im Jahr 2009 insgesamt 37 MRSP aus Nordamerika einem gemeinsamen Haupt-Cluster zuordnen, während *mecA*-negative Isolate spezifische und deutlich diversere Bandenmuster zeigten.

Dies bedeutet letztlich auch, dass ohne die epidemiologische Analyse vor Ort die Makrorestriktionsanalyse nicht als Beleg für die Übertragung von MRSP zwischen Patienten einer Klinik ausreicht. Weitere Optionen müssen zumindest berücksichtigt werden. Patienten mit identischen MRSP können prinzipiell auch einen erfolgreichen Klon unabhängig voneinander mit in die Klinik gebracht haben. Insbesondere angesichts der Häufigkeit bestimmter PFGE Subtypen (z.B. A-1), die im Rahmen dieser Arbeit in vollkommen verschiedenen Regionen Deutschlands bzw. Europas im Abstand von mehreren Monaten oder Jahren immer wieder nachgewiesen wurden, erscheint dies plausibel. Auch endemische Ereignisse, z.B. die MRSP-Kolonisation mit identischen Klonen bei Tieren desselben Züchters, Händlers oder Besitzers, die dann als Patienten in eine Klinik kommen, müssen bei der Analyse in Betracht gezogen werden und schränken die Rückschlüsse der PFGE - Ergebnisse auf die nosokomiale Bedeutung von MRSP ein.

Dennoch sollten die Ergebnisse dieser Arbeit als Hinweis auf ein wachsendes nosokomiales Problem verursacht durch Methicillin- und multiresistente *S. pseudintermedius* gewertet werden, der einen dringenden Handlungsbedarf verdeutlicht.

Mögliche Ursachen für das zeitverzögerte Auftreten nosokomialer Infektionen in veterinärmedizinischen Einrichtungen im Vergleich zu humanmedizinischen Kliniken, in denen diese Probleme seit vielen Jahrzehnten bekannt sind, können darauf beruhen, dass es einerseits Langzeiteinrichtungen wie z.B. Pflege- oder Altersheime in der Veterinärmedizin nicht gibt, und andererseits auch Bereiche wie Intensiv- und Notfallmedizin sich erst seit einigen Jahren vermehrt entwickeln und humanmedizinischen Standards angleichen. Während sich vor wenigen Jahrzehnten in vielen Fällen die Patientenbesitzer in Notfällen und komplizierten Krankheitsgeschehen für die Euthanasie des Tieres entschieden, stehen heute in einigen Bereichen komplexere Therapien, aufwendigere Operationen und auch verlängerte Aufenthalte in Tierkliniken und Intensivstationen zur Option [12, 41]

Die Prävention nosokomialer Infektionen fußt dabei im Wesentlichen auf der Kontrolle der endogenen Mikrobiota des Patienten (z.B. aseptische Patientenvorbereitung), der verminderten Transmission zwischen Patienten und/ oder Personal (z.B. Personal- und Händehygiene) und der Kontrolle der Klinikumgebung (Reinigung und Desinfektion aller Räume, Oberflächen etc.). Dies betrifft Kliniken und Praxen gleichermaßen und erfordert gegebenenfalls gezielte, strategische (Hygiene-) Protokolle zur Umsetzung. Die Patientenvorbereitung bei invasiven Prozeduren wie Operationen oder dem Legen von Venen- und Harnkathetern erfordert prinzipiell eine strikt aseptische Technik und im Anschluss eine tägliche Untersuchung auf Rötungen, Schwellungen oder andere Entzündungszeichen. Gegebenfalls müssen Katheter entfernt werden und mikrobiologische Untersuchungen des Katheters oder eines Wundtupfers angefordert werden. Generell sollten

unnötige Manipulationen an Venen- oder Harnkathetern vermieden werden, die weitere Notwendigkeit des Katheters täglich hinterfragt werden und gegebenenfalls regelmäßige Erneuerungen durchgeführt werden. Während chirurgischer Eingriffe sollten Personenzahl und -verkehr sowie Gespräche im Operationsraum auf ein Mindestmaß reduziert werden. Neue Entwicklungen in der Technologie invasiver Geräte und Materialien (z.B. Silber-impregnierter Venenkatheter, die die Biofilmbildung reduzieren) können ebenfalls zur Prävention nosokomialer Infektionen beitragen [65, 251].

Die Verhinderung der Transimission nosokomialer Erreger zwischen den Patienten sowie zwischen Personal und Patienten stellt einen zentralen Aspekt bei der Prävention dar. In Kliniken sollten Hygienebeauftragte bzw. Hygieneteams sowohl für eine regelmäßige Schulung des Personals als auch für die Einhaltung von Protokollen und strikten Hygieneregeln verantwortlich sein. Insbesondere die Händehygiene stellt einen scheinbar simplen und doch kritischen Aspekt dar. Verschiedene humanmedizinische Studien konnten den starken Einfluss der Händehygiene auf die Prävention nosokomialer Infektionen zeigen, insbesondere auch am Beispiel von MRSA [252-254], doch ebenso viele Studien beklagen auch die schlechte Compliance von Ärzten und Personal bei der Umsetzung [255-257]. Internationale Kampagnen (z.B. von der WHO „clean care is safer care“; oder in Deutschland die „Aktion saubere Hände“) haben es sich zum Ziel gemacht durch gezielte Schulungen des Personals, klare Richtlinien seitens der Kliniken und eine erhöhte Zahl von Händedesinfektionsmittelspendern und Kitteltaschenflaschen die Compliance des Klinikpersonals langfristig zu erhöhen. Auch veterinärmedizinische Einrichtungen können von derlei Maßnahmen nur profitieren, insbesondere die angesprochenen Kitteltaschenflaschen sind hier als sofort wirksame Maßnahmen zu empfehlen.

Patienten, die mit Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSP und MRSA) kolonisiert oder infiziert sind, sollten von anderen Tieren isoliert in gekennzeichneten Boxen oder Käfigen untergebracht werden und besondere Hygienemaßnahmen, wie z.B. bereichsgebundene Kittel und das Tragen von Handschuhen sollten berücksichtigt werden [258]. In den technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA250), die für den beruflichen Umgang mit Menschen und Tieren Anwendung finden, ist in einem eigenen Abschnitt über MRSA gefordert „(...) Beschäftigte hinsichtlich der Bedeutung und des Umgangs mit MRSA-kolonisierten oder infizierten Patienten sowie über die erforderlichen besonderen Hygienemaßnahmen zu unterrichten“. Ähnliches sollte zum Schutz von Personal und Patienten auch für MRSP gelten.

Auch die regelmäßige und gründliche Reinigung und Desinfektion der Räumlichkeiten sowie die Funktionsprüfung von Sterilisatoren und Autoklaven stellt einen ebenso selbstverständlichen wie wesentlichen Aspekt bei der Prävention nosokomialer Infektionen dar. Beides kann z.B. durch Dokumentationspflicht gewährleistet und kontrolliert werden.

Die Ergebnisse der molekularen Typisierung mittels MLST und *spa*-Typing der MRSP dieser Arbeit sollen, in Ergänzung zu den Erkenntnissen zur Prävalenz von MRSP, Aufschluss geben über die genetische Verwandtschaft der Isolate und möglicherweise Rückschlüsse über

die Eignung und Aussagekraft der verschiedenen Typisierungsmethoden erlauben. Insgesamt zeigen die Typisierungsergebnisse der 146 MRSP eine recht geringe Diversität europäischer MRSP im Vergleich zu MSSP sowie eine deutliche Abgrenzung *mecA*-positiver Sequenztypen von *mecA*-negativen. Insbesondere die Ergebnisse der Multilocus-Sequenztypisierung der *housekeeping* Gene *pta*, *cpn60*, *tuf* und 16S rRNA sowie des globalen Virulenzregulators *agrD* deuten auf eine begrenzte Diversität der europäischen MRSP. Es wurden in dieser Arbeit nur zwei Sequenztypen identifiziert (ST5 und ST71), und die weit überwiegende Mehrheit der typisierten Isolate gehört zum ST71. Nur ein einziges MRSP-Isolat gehört zum ST5 (siehe Publikation 2). Vergleicht man diese Daten mit bereits publizierten MLST-Ergebnissen, so fällt auf, dass *mecA*-positive *S. pseudintermedius* einer relativ begrenzten Anzahl von Sequenztypen angehören (ST29, ST68, ST69, ST70, ST71, ST73, ST105) während *mecA*-negative *S. pseudintermedius* zu einer Vielzahl von verschiedenen Sequenztypen gehören. Bannoehr et al. haben in 89 vorwiegend europäischen *mecA*-negativen *S. pseudintermedius* (MSSP) 61 verschiedene STs identifiziert und Black et al. haben kurz darauf in 22 amerikanischen MSSP 15 weitere, neue Sequenztypen identifiziert. Besonders auffällig ist, dass der weit überwiegende Teil der europäischen MRSP dem ST71 angehört, während nordamerikanische MRSP meist dem ST68 angehören, es also deutliche regionale Unterschiede gibt, die sich auch in unterschiedlichen *spa*-Typen und SCC*mec*-Elementen widerspiegeln. Sowohl ST68 in Nordamerika als auch ST71 in Europa stellen sich jeweils als deutlich dominante Sequenztypen in MRSP dar. Andere MRSP-Sequenztypen (ST29, ST69, ST70, ST73, ST105) kommen in Europa und in Nordamerika eher vereinzelt und sporadisch vor. Weiterhin auffällig ist, dass Sequenztypen von MSSP und MRSP anscheinend nicht häufig geteilt werden. Nur innerhalb von zwei Sequenztypen (ST5 und ST29) sind bisher sowohl MRSP als auch MSSP bekannt, allerdings auch hier in sehr begrenzter Anzahl sowohl von MRSP als auch MSSP [118, 203, 259].

Dies legt nahe, dass möglicherweise nur bestimmte *S. pseudintermedius* Genotyp-Linien aus bislang unbekanntem Gründen in der Lage sind, das Resistenzelement SCC*mec* aufzunehmen. Das seltene Vorkommen von SCC*mec* bzw. Schwierigkeiten z.B. das verhältnismäßig große Element SCC*mec*III aufzunehmen und auszutauschen wurden ebenfalls als Ursachen für das Auftreten einzelner dominanter MRSP-Linien angeführt [203]. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass das derzeitige verwendete „MLST-Schema“ entwickelt wurde, um primär Erkenntnisse über die Speziesdiversität der drei Staphylokokken-Spezies der SIG zu erhalten und nicht zur phylogenetischen Analyse von *S. pseudintermedius*. Es ist einerseits noch nicht vollkommen sicher, ob alle derzeit zur Sequenzanalyse herangezogenen Gene geeignet sind, um validierte phylogenetische Rückschlüsse auf die Entwicklung von MRSP generell zu ziehen, und ob andererseits fünf Gene dafür insgesamt ausreichend sind. Der globale Virulenzregulator *agrD* z.B. ist möglicherweise nicht als MLST Marker geeignet. Für *S. pseudintermedius* sind insgesamt vier *agrD*-Varianten beschrieben (I bis IV). Die in dieser Studie typisierten MRSP gehören hauptsächlich dem *agrD*-Typ III (ST71) an, ein Isolat gehört zum *agrD*-Typ II (ST5). Bannoehr et al. konnten allerdings zeigen, dass die normalerweise streng speziesspezifischen *agrD*-Alleltypen teilweise innerhalb der drei

Spezies der SIG geteilt werden. Die Varianten I, II und IV sind auch in *S. delphini* identifiziert und *S. intermedius* teilt Typ I mit den beiden anderen Spezies [118].

Weiterhin konnte keine klonale Assoziation der *agrD*-Allele festgestellt werden. Stämme, die dieselben Alleltypen in den anderen Loci teilen (*pta*, *tuf*, *cpn60* und 16S rRNA) gehören verschiedenen *agrD*-Alleltypen an und phylogenetische Bäume, die aus Sequenzdaten von *agrD* konstruiert wurden, unterschieden sich stark von denen, die auf den Sequenzen der anderen vier Loci beruhen. Dies hat zur Vermutung geführt, dass der evolutionär frühe Transfer von *agrD* sowie assortive Rekombinationen zur Verteilung der *agrD*-Allele innerhalb der SIG geführt haben. Während sich bei *S. aureus* Verbindungen bestimmter *agrD*-Typen zu geografischen Regionen, Wirten oder klinischen Vorberichten ziehen lassen, ist dies bei *S. pseudintermedius* nicht der Fall.

Auch das 16S rRNA Fragment des derzeitigen SIG-MLST-Schemas ist möglicherweise nicht zur phylogenetischen Analyse verschiedener MRSP-Stämme geeignet. Obwohl intragenomische Heterogenität bzw. 16S rRNA-Polymorphismen für verschiedene Bakterienspezies beschrieben sind [260], sind für *S. pseudintermedius* bislang nur drei 16S rRNA Allel-Typen beschrieben und ein Großteil der Stämme gehört demselben Allel-Typ an. Black et al. haben in allen typisierten *S. pseudintermedius* (MSSP und MRSP) identische 16S rRNA Sequenzen identifiziert, obwohl sich anhand der anderen Loci große Diversitäten, insbesondere bei den MSSP zeigten. Einige 16S rRNA Allel-Typen werden außerdem von verschiedenen SIG-Spezies geteilt, z.B. haben *S. pseudintermedius* und *S. delphini* sowie *S. delphini* und *S. intermedius* identische 16S rRNA-Allele [118]. Eine Auswahl von sieben gut geeigneten *housekeeping* Genen zur phylogenetischen Analyse von MRSP kann vermutlich erst getroffen werden, wenn eine vollständige Genom-Sequenz von *S. pseudintermedius* vorliegt, an der derzeit noch gearbeitet wird.

Eine Ergänzung zur MLST ist die Single-Locus-Sequenztypisierung des putativen *spa*-Gens von *S. pseudintermedius*. Dieses erst kürzlich für *S. pseudintermedius* entwickelte Verfahren, ist bei der Typisierung von MRSA bereits seit einigen Jahren als zuverlässige, kostengünstige und aussagekräftige Methode anerkannt [223]. Für MRSP sind bislang nur sehr begrenzte Ergebnisse über das *spa*-Typing verfügbar. Moodley et al. haben insgesamt 31 MRSP damit untersucht; in dieser Arbeit wurden alle 146 Stämme *spa*-typisiert. In europäischen Isolaten sind bislang die Typen t02, t03, t04, t05 und t09 identifiziert worden, während in vier nordamerikanischen MRSP-Isolaten der Typ t06 identifiziert wurde.

Auch beim *spa*-Typing zeigt sich deutlich die begrenzte Diversität von MRSP, da in Europa ebenfalls ein Typ (t02) dominiert, der auch in dieser Arbeit im weit überwiegenden Teil (93,15%) der MRSP gefunden wurde (siehe Publikation 2). Allerdings wurden vereinzelt auch andere *spa*-Typen identifiziert, so dass letztlich innerhalb eines Multilocus-Sequenztyps (ST71) auch unterschiedliche *spa*-Typen zu finden waren (t05, t06, t15 und t23). Zwei dieser Typen (t15 und t23) wurden bislang noch nicht für MRSP publiziert. Der Typ t06 ist bislang bei den von Moodley et al. typisierten vier nordamerikanischen MRSP nachgewiesen worden. Vergleicht man die genauen Unterschiede in der Repeat-Abfolge der fünf identifizierten *spa*-Typen, ist jedoch zu erkennen, dass sich diese Isolate ausschließlich in der

Anzahl des zentralen Repeats r03 unterscheiden, der je nach Typ zwischen ein und fünfmal vorhanden ist. Dies zeigt eine nahe Verwandtschaft dieser europäischen *spa*-Typen, und hat zu der Vermutung geführt, dass eine genetische Rekombinationen oder aber eine konvergente Evolution des dominanten t02 zu den anderen *spa*-Typen in ST71 geführt hat. Auch die beiden anderen vereinzelt in Europa gefundenen *spa*-Typen (t04 in Deutschland und t09 in Großbritannien) unterscheiden sich nur durch die unterschiedliche Anzahl des zentralen r03 sowie einzelne Punktmutationen, und stützen damit diese Theorie. Allerdings wurde in dieser Arbeit auch t06 in einem ST71- Stamm gefunden, obwohl dieser Typ bislang nur in MRSP der genetisch differenten ST68-Linie aus Nordamerika identifiziert wurde. Da bislang jedoch insgesamt nur vier Isolate aus Nordamerika in das *spa*-Typing integriert wurden, können hier sicher noch keine Rückschlüsse gezogen werden. Weitere Studien sollten auch eine größere Anzahl MSSP dem *spa*-Typing unterziehen, um Vergleiche zwischen MRSP und MSSP ziehen zu können, aber auch um zu beurteilen, inwieweit sich das *spa*-Typing bei MSSP eignet. Moodley und Kollegen gaben selbst zu bedenken, dass nur bei 58% der von ihnen typisierten MSSP das *spa*-Typing möglich war und folgerten daraus, dass das *spa*-Gen nicht in allen Stämmen der Spezies vorhanden ist bzw. verschiedene Allele nicht mit den benutzten Primern zu erfassen sind. Um die Eignung des *spa*-Typing für epidemiologische Studien über *S. pseudintermedius* beurteilen zu können, müssen daher weitere Studien auch *mecA*-negative Stämme erfassen. Dennoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es zumindest mehrheitlich bei der Typisierung *mecA*-positiver Stämme erfolgreich ist. Bis auf eine einzige Ausnahme waren die Sequenzen aller 146 untersuchten Stämme eindeutigen Repeat-Abfolgen zuzuordnen. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie lieferte jedoch Hinweise darauf, dass das *spa*-Gen in *S. pseudintermedius* zweimal enthalten ist und die X-Region dieses zweiten *spa*-Gens partielle Deletionen aufweist [228]. Ein mehrfaches Vorhandensein von *spa* im Genom von *S. pseudintermedius* limitiert den Nutzen und die Aussagekraft dieser Methode erheblich und macht es für weitere Studien unter Umständen obsolet.

Das SCC*mec*-Typing stellt ein weiteres aufschlussreiches Typisierungsverfahren dar, da man davon ausgeht, dass Rekombinationen verschiedener SCC*mec*-Elemente sowie Veränderungen innerhalb eines Elements selten sind und damit ein Einblick in die Evolution resistenter Stämme möglich ist [233]. Die Ergebnisse des PCR-basierten SCC*mec*-Typing in dieser Arbeit ordnen den Großteil (94,5%) der 146 MRSP einem gemeinsamen SCC*mec*-Element zu (SCC*mec*III). Acht Stämme ergaben PCR-Signale für mehrere Rekombinasegene (*ccrAB3* und *ccrAB2*) und wurden daher als nicht-typisierbar entsprechend dem gegenwärtigen SCC*mec* Schema für *S. aureus* bezeichnet. Auch andere Publikationen haben SCC*mec*III häufig in MRSP identifiziert, allerdings sind auch andere Varianten (SCC*mec*V bzw. SCC*mec*V<sub>T</sub>, SCC*mec*VII-241, zusammengesetzte Elemente: SCC*mec*I-II-IV und SCC*mec*II-III) für MRSP beschrieben [201, 203, 228]. Auch das SCC*mec*-Typing zeigt, wie schon vorher die MLST und *spa*-Analyse, klare kontinentale Unterschiede: MRSP des ST68 aus Nordamerika beinhalten in der Regel das Element SCC*mec*V bzw. seine Variante SCC*mec*V<sub>T</sub>, während europäische MRSP häufig SCC*mec*III beinhalten. Dies lässt auf eine

völlig andere klonale MRSP-Linie in Nordamerika schließen, die aus einem völlig anderen Hintergrund generiert wurde. Interessanterweise sind in MRSA animalen Ursprungs meist vollkommen andere SCC*mec*-Elemente zu finden als in animalen MRSP. Die meisten animalen MRSA beinhalten das kleinere SCC*mec*IV bzw. Subtypen davon [261-263], das häufig auch in so genannten community-acquired-MRSA ohne Verbindung zu klinischen Einrichtungen gefunden wird [264]. Da SCC*mec*IV kleinere J-Regionen als die anderen SCC*mec* Varianten hat, ist es insgesamt erheblich kleiner (21 kbp) und man hat vermutet, dass es deshalb mobiler ist und leichter zwischen verschiedenen *S. aureus* Stämmen in der Gesellschaft ausgetauscht werden kann. Aufgrund der kleineren J-Regionen finden sich auch weniger bzw. keine zusätzlichen Resistenzgene in SCC*mec*IV [197]. Die community-acquired MRSA und die MRSA von Tieren mit SCC*mec*IV zeigen vielleicht auch deshalb eine etwas schwächer ausgeprägte Multiresistenz als die bislang typisierten MRSP. SCC*mec*III hingegen gehört zu den größten Elementen (67 kbp) und beinhaltet auf seinen drei J-Regionen einige weitere Resistenzgene in integrierten Plasmiden und Transposons. Die unterschiedlichen SCC*mec*-Elemente in animalen MRSA und MRSP legen nahe, dass nicht die Übertragung von SCC*mec* zwischen MRSA und sensiblen *S. pseudintermedius* Ursache der Entstehung von MRSP ist, sondern es einen alternativen Ursprung der Methicillin-Resistenz in *S. pseudintermedius* geben muss. SCC*mec*III ist in humanen MRSA häufig bei nosokomialen epidemischen MRSA (EMRSA) in Asien, Südamerika und Osteuropa beschrieben [265], häufig assoziiert mit ST239 und ausgeprägter Multiresistenz [266]. Jüngst wurde ein hoch übertragbarer MRSA dieses STs in Intensivstationen in London gefunden, der besonders oft assoziiert ist mit Bakteriämien und Septitiden. Dieser Stamm trägt eine SCC*mec*III-Variante, die zusätzliche Resistenzgene auch gegenüber Antiseptika wie kationischen Bioziden und quaternären Ammonium Verbindungen enthält [267].

Letzlich ist der Ursprung des SCC*mec*-Elements in MRSP bislang jedoch unklar und unklar ist auch, ob die in MRSP detektierten SCC*mec*-Typen wirklich vollkommen identisch mit den in *S. aureus* identifizierten sind. Black und Kollegen haben ein SCC*mec*V-Element eines repräsentativen MRSP-Stamms sequenziert und konnten eine weitgehende Homologie mit SCC*mec*V in *S. aureus* feststellen [203]. Ob dies auch für SCC*mec*III der Fall ist, kann durch alleinige PCR-basierte Detektion einzelner Charakteristika nicht beurteilt werden. Auch die genaue Zusammensetzung der untypisierbaren Elemente dieser Arbeit kann nur durch Sequenzierung des gesamten Elements geklärt werden.

Die bislang recht begrenzten publizierten Daten über MRSP deuten sowohl auf eine klonale Ausbreitung bestimmter Linien, als auch auf eine regionale Selektion und Erhaltung erfolgreicher Klone hin, während direkter horizontaler Transfer von SCC*mec* zwischen verschiedenen Sequenztypen wohl bislang ein eher seltenes Ereignis ist. Ähnliches wurde über lange Zeit für MRSA vermutet. Viele Studien, die anhand von MLST und *spa*-Typing eine begrenzte Diversität globaler MRSA nachweisen konnten, führten zu der These, dass einige erfolgreiche, epidemische MSSA-Stämme unabhängig voneinander das SCC*mec*-

Element aufgenommen haben und sich dann als global zirkulierende MRSA-Genotypen verbreitet haben [219].

Eine kürzlich erschienene Studie hat 135 global verteilte Isolate desselben MRSA-Sequenztyps (ST5) anhand von so genannten Single-Nucleotide-Polymorphismen (SNP) in 108 verschiedenen Loci des Genoms genauer analysiert [233]. Single-Nucleotid-Polymorphismen beruhen auf Punktmutationen und gehören zu den häufigsten Sequenzvariationen im bakteriellen Genom. Ihre Analyse kann daher sehr präzise Einblicke in die evolutionäre Geschichte von Bakterien geben. Innerhalb der 135 MRSA des ST5 konnten anhand der SNP-Analyse 89 verschiedene Haplotypen identifiziert werden, die sich vor allem in regional-geografischen Clustern ordnen. Der Vergleich mit *spa*-Typisierungsergebnissen dieser Stämme konnte zeigen, dass verwandtschaftlich weit entfernte Haplotypen teils identische *spa*-Typen beinhalten können. Die Autoren vermuteten eine wiederholte, konvergente Evolution der *spa*-Sequenzen zu verschiedenen Gelegenheiten als Ursache und gaben zu bedenken, dass eine alleinige Analyse der *spa*- und MLST-Sequenzen unkorrekte Rückschlüsse auf die Verbreitung dieser Stämme zur Folge hätte. Dieselben *spa*-Typen innerhalb von verschiedenen Stämmen desselben STs, die global auf verschiedenen Kontinenten gefunden wurden, hätten zu der Annahme geführt, dass sich bestimmte Klone global verbreitet haben, obwohl eigentlich unabhängige Haplotypen dieses STs nur zufällig dieselben *spa*-Sequenzen teilen.

Auch für MRSP erscheint es zunächst plausibel, dass mehrere Male unabhängig voneinander bestimmte Linien das *SCCmec*-Element aufgenommen haben und nicht ein gemeinsamer resistenter Vorläufer existiert. Möglicherweise könnte eine genauere molekulare Analyse von MRSP-ST71 ähnlich überraschende Ergebnisse wie bei MRSA-ST5 ergeben. Weitere Studien sollten daher auch eine SNP-Analyse möglichst zahlreicher Loci mit einbeziehen, und das *spa*-Typing dann gegebenenfalls in diese Ergebnisse einbetten. Nübel et al. [233] vermuteten weiter, dass vor allem unterschiedliche *SCCmec*-Elemente innerhalb eines MRSA-STs dafür sprechen, dass *SCCmec* viele Male unabhängig von verschiedenen Genotypen aufgenommen wurde. In den 135 Stämmen des ST5 wurden sechs verschiedene *SCCmec* Varianten sowie weitere untypisierbare Elemente gefunden, was für eine häufige Integration von *SCCmec* in verschiedene *MSSA*-Haplotypen eines STs spricht. Eine wesentliche Bestätigung dieser These wäre die Präsenz derselben Haplotypen in lokalen MRSA und *MSSA* bzw. MRSP und *MSSP*. Dies kann bislang jedoch nicht belegt werden und erfordert weitere Untersuchungen. Auch die Quelle von *SCCmec* müsste dann in der Umgebung *mecA*-negativer Stämme gefunden werden. Koagulase-negative Staphylokokken (KoNS), die zahlreiche Wirte von *S. aureus* oder *S. pseudintermedius* ebenfalls kolonisieren können, beinhalten sehr häufig *SCCmec*-Elemente und könnten als mögliches *SCCmec*-Reservoir für virulentere Spezies wie *S. aureus* oder *S. pseudintermedius* dienen [268]. Tatsächlich findet sich in KoNS eine große Diversität verschiedener *SCCmec*-Elementen und auch für verschiedene animale KoNS sind *SCCmecIII*-Elemente beschrieben [268]. Ob diese tatsächlich für sensible

*S. pseudintermedius* als Donor von SCCmecIII fungieren könnten, müssen dennoch zukünftige Studien prüfen.

Methicillin-resistente Staphylokokken (MRS) sind *per definitionem* als *in vivo* resistent gegenüber allen  $\beta$ -Lactam-basierenden Antiinfektiva einzustufen [205, 269]. Der Einsatz von  $\beta$ -Lactamen und  $\beta$ -Lactamase-festen Wirkstoffen bei Infektionen mit MRS ist also wirkungslos und damit kontraindiziert. Resistenzen von *S. (pseud)intermedius* gegenüber  $\beta$ -Lactamase-festen Wirkstoffen wie Methicillin oder Cephalosporinen werden erst seit einigen Jahren vermehrt beobachtet. In Studien aus den Jahren 1984 und 1989 wurden in caninen *S. (pseud)intermedius* keinerlei Resistenzen gegenüber Methicillin oder Cephalothin festgestellt, während jedoch ein Großteil der Stämme Resistenzen gegenüber Ampicillin, Penicillin G aufwies [270]. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine weitere Studie, jedoch mit höheren Raten Penicillin-resistenter Stämme [124]. Eine groß angelegte Studie (1980-1996) von Lloyd et al. hat insgesamt 2269 canine Stämme auf Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen untersucht, dabei konnten keinerlei Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Lactamase-festen Antiinfektiva wie Methicillin, Oxacillin oder Amoxicillin/Clavulansäure festgestellt werden. Nur ein einziges Isolat zeigte sich resistent gegenüber Cefalexin [271]. Inzwischen sind jedoch Resistenzen bei *S. (pseud)intermedius* gegenüber diesen Wirkstoffklassen, insbesondere bei Isolaten von Hunden und Katzen häufig beschrieben [48, 129, 244, 249].

Die Ergebnisse der MHK-Testung von MRSP gegenüber  $\beta$ -Lactamen in dieser Arbeit haben gezeigt, dass sich MRSP *in vitro* insbesondere gegenüber Cephalosporinen und Carbapenemen häufig sensibel zeigen, obwohl die Stämme nachweislich Träger des *mecA*-Gens und damit *in vivo* resistent sind. Diese heterogene Ausprägung des Resistenzphänotyps ist bei einigen  $\beta$ -Lactamen auch für Methicillin-resistente *S. aureus* häufig beschrieben und bedingt nicht selten Komplikationen für die rein phänotypische Diagnostik von MRSA [189]. Während jedoch bei MRSA der phänotypische Nachweis der Resistenz gegenüber Cefoxitin, einem Cephalosporin der zweiten Generation, in der Regel zuverlässig und daher weit verbreitet ist, scheint Cefoxitin zum Nachweis der Methicillin-Resistenz in *S. pseudintermedius* nicht geeignet [272]. Im Falle einer durch *S. pseudintermedius* verursachten postoperativen Wundinfektion bei einem Hund, wurde im Agardiffusionsverfahren erst kürzlich eine Sensibilität von *S. (pseud)intermedius* gegenüber Cefoxitin beobachtet, obwohl es sich um ein Methicillin-resistentes Isolat handelte [240]. In dem dort beschriebenen Fall wurde der Patient zunächst längere Zeit erfolglos mit einem Cephalosporin der ersten Generation behandelt (Cefalexin), und erst eine Umstellung der Therapie auf Doxycyclin nach sicherer MRSP-Diagnose brachte letztlich den Therapieerfolg. Das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) hat im Jahr 2008 neue Interpretationskriterien für den Resistenznachweis in Staphylokokken von Tieren veröffentlicht, die in der Folge von verschiedenen Studien hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit für den Nachweis von MRSP in Frage gestellt wurden. Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass die 2008 veröffentlichten Kriterien für Koagulase-positive Staphylokokken unabhängig

vom Testverfahren eine unzureichende Sensitivität für den Nachweis der phänotypischen Cefoxitin-Resistenz von MRSP liefern [239, 273]. Der Nachweis der Oxacillin-Resistenz im Agardiffusionsverfahren unter Berücksichtigung der CLSI Kriterien aus dem Jahr 2004 hat sich als zuverlässigstes phänotypisches Verfahren für den MRSP-Nachweis erwiesen. Cefoxitin sollte zum Nachweis von MRSP nicht herangezogen werden. Ein Nachweis des Resistenz kodierenden Gens *mecA* bleibt aber wohl weiterhin der Goldstandard zum Nachweis der Methicillin-Resistenz in *S. pseudintermedius* und beugt falschen Befundinterpretationen durch vermeintliche Sensitivität gegenüber Cephalosporinen vor. Dies unterstreicht einmal mehr die Notwendigkeit guter mikrobiologischer Labordiagnostik und Befundinterpretation, um falsche Therapieempfehlungen, die sowohl Therapieversagen als auch weitere Resistenzentwicklungen zur Folge haben, zu verhindern. Auch der initiale, empirische Einsatz von Cephalosporinen seitens der behandelnden Tierärzte bei caninen Infektionen sollte hinterfragt werden. Cephalosporine sind die am häufigsten eingesetzten Antiinfektiva zur Behandlung von *S. (pseud)intermedius* Infektionen beim Hund [274]; [275], aber steigende Prävalenzen von MRSP, die sich *in vitro* als sensibel gegenüber Cephalosporinen zeigen, sprechen klar gegen den empirischen Einsatz dieser Wirkstoffe.

Die in dieser Arbeit typisierten MRSP zeichnen sich neben der Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactamen auch durch Resistenzen gegenüber weiteren Klassen antimikrobieller Wirkstoffe, wie z.B. Aminoglykosiden, Macroliden und Lincosaminen sowie Fluorchinolonen aus, und sind damit fast ausnahmslos als multiresistent zu bezeichnen. Die Resistenzlage von *S. (pseud)intermedius* wird seit Mitte der achtziger Jahre untersucht [276] und obwohl multiresistente Stämme vereinzelt auch schon seit Ende der achtziger Jahre beobachtet wurden, [277], zeigt sich erst während der letzten zehn Jahre eine deutlich ansteigende Tendenz der Prävalenz multiresistenter Stämme. Eine französische Studie aus dem Jahr 1998 hat die Prävalenz multiresistenter *S. (pseud)intermedius* zwischen 1986 und 1987 mit der aus den Jahren 1995-1996 verglichen und dabei einen Anstieg von 11% auf 28% festgestellt [277]. Auch Daten zur Resistenzlage von *S. (pseud)intermedius* gegenüber Fusidinsäure und Tetrazyklinen aus Norwegen haben zwischen den Jahren 1986 und 1987 Resistenzlevel von 1% bzw. 20% ergeben, während die Werte im Jahr 2002 bei 59% bzw. 53% anzunehmen waren [278]. Amerikanische Studien aus den Jahren 2004 bis 2007 haben schließlich auch deutlich ansteigende Raten von caninen methicillin- und multiresistenten *S. (pseud)intermedius* gezeigt, einschließlich Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen [243, 244, 279] und auch gegenüber Macroliden, Lincosaminen und Gentamycin zeigen sich MRSP in vielen Studien mittlerweile resistent [280].

Die Ursache dieser außerordentlichen Multiresistenz und auch ein möglicher Zusammenhang zu SCC*mec* sind bislang unklar. *S. (pseud)intermedius* ist häufig chromosomal resistent gegenüber Wirkstoffen, deren Resistenzgene bei anderen Staphylokokken Spezies in der Regel auf Plasmiden liegen [281]. In animalen *S. (pseud)intermedius* Isolaten verschiedener Tierarten wurden spezifische Insertionssequenzen, wie IS257 z.T. in mehrfacher Kopie im

chromosomalen Genom identifiziert, diese ermöglichen möglicherweise weiteren extrachromosomalen Resistenzgenen die Integration in die chromosomale DNA [281].

Fast alle Stämme dieser Studie sind *in vitro* resistent gegenüber Macroliden/ Lincosaminen. Dies sind Wirkstoffe, die in der Veterinärmedizin sehr häufig zur Behandlung bakterieller Infektionen, insbesondere bei Penicillin-resistenten *S. (pseud)intermedius*, eingesetzt werden [282, 283]. In Macrolid/Lincosamin-resistenten Staphylokokken von Hunden und Katzen wurden sowohl die transposonkodierte Resistenzgene *erm(A)* und *erm(B)* sowie die plasmidkodierte Gene *msr(A)* und *mph(C)* nachgewiesen, besonders das Methylase-Gen *erm(B)* wurde bei *S. (pseud)intermedius* häufig gefunden und die Expression kann hier *in vitro* sowohl konstitutiv als auch induzierbar sein [284, 285]. Die Resistenz gegenüber Macroliden ist bei *S. (pseud)intermedius* außerdem häufig mit Resistenzen gegenüber anderen Wirkstoffen wie Aminoglykosiden und Lincosaminen assoziiert. Im Falle der Aminoglykosid-Resistenz konnte gezeigt werden, dass dies sehr oft auf der Präsenz von Tn5405-ähnlichen Elementen, also kleinen mobilen genetischen Elementen, beruht, die in enger Verbindung zu *erm(B)* im Genom von *S. (pseud)intermedius* vorhanden sind und verschiedene Aminoglykosid-Resistenzgene (*aaadE*, *sat4*, *aphA-3*) enthalten [285]. Diese Elemente wurden wahrscheinlich von Enterokokken auf *S. (pseud)intermedius* übertragen, bzw. horizontal zwischen verschiedenen *S. (pseud)intermedius* Stämmen ausgetauscht [285]. Auch in dieser Arbeit zeigte sich eine Verbindung der *in vitro* Resistenzen gegenüber Macroliden und Aminoglykosiden sowie dem Lincosamid Clindamycin, das heißt Resistenzen gegenüber diesen Wirkstoffgruppen treten auch hier meist gekoppelt auf (siehe Publikation 2).

Der in den MRSP-Stämmen dieser Arbeit häufig identifizierte SCC*mec* Typ III enthält verschiedene Kopien von Transposons und Plasmiden (pT181, Tn554), die wiederum Gene für Macrolid/Lincosamin- (*ermA*), Tetrazyklin- (*tetK*) sowie Cadmium- (*cadB* und *cadC*) Resistenzen beherbergen und von der Insertionssequenz IS431 flankiert sind [197]. Dennoch bleibt zu klären, ob diese Resistenzen auf den möglicherweise in SCC*mec* vorhandenen Resistenzgenen beruhen, oder ob und in welcher Weise auch chromosomale Resistenzdeterminanten beteiligt sind. Da bislang allerdings vollständige Sequenzen der verschiedenen SCC*mec*-Varianten von MRSP nur vereinzelt (SCC*mec*II-III, SCC*mec*V und SCC*mec* VII-241) vorliegen, kann über die genaue Zusammensetzung von SCC*mec*-Elementen in den MRSP-Stämmen dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden.

Eine mögliche Ursache der auffälligen Multiresistenz von caninen MRSP wurde bereits in dem Umstand gesucht, dass die häufig durch *S. pseudintermedius* verursachte canine Pyodermie oftmals wiederholt und über längere Zeit mit teils wechselnden antimikrobiellen Wirkstoffen behandelt wird [143, 286]. Besonders die tiefe Pyodermie wird meist noch über einen Zeitraum von 3-4 Wochen nach klinischer Verbesserung mit oralen Antiinfektiva behandelt. Zum Einsatz kommen dabei meist potenzierte Sulfonamide, Macrolide, Lincosamide, Fluorchinolone sowie Cephalosporine der ersten Generation [286]. Diese Vorgehensweise hat möglicherweise einen Selektionsdruck ausgeübt, der in der Folge zur Selektion multiresistenter Stämme geführt hat [38, 283, 287].

Dennoch hat kürzlich eine Studie auch in *mecA*-negativen *S. pseudintermedius*, die von Hunden ohne vorherige antimikrobielle Behandlung isoliert wurden, Resistenzen und Multiresistenzen gezeigt und den Transfer von Resistenzgenen zwischen *S. pseudintermedius* Stämmen und anderen Bakterien der kaninen Mikrobiota nahe gelegt [250]. Dies könnte also ein Hinweis darauf sein, dass die Multiresistenz in MRSP nicht zwingend auf das SCC*mec*-Element zurückzuführen ist. Der SCC*mec*-unabhängige Austausch von Resistenzgenen zwischen verschiedenen Staphylokokkenspezies der Hautmikrobiota ist ein häufiges Ereignis und kann bei engem Kontakt auch zwischen den Bakterien von Hunden bzw. Haustieren und ihren Besitzern nicht ausgeschlossen werden [288].

In jedem Fall ist nach der bakteriologischen Diagnostik ein Antibiogramm und gegebenenfalls ein genbasierter Nachweis von *mecA* bei der Auswahl geeigneter Wirkstoffe nicht nur für den Therapie-Erfolg sondern zur Verhinderung der weiteren Resistenzselektion erforderlich und unabdingbar. Besonders im Falle der oberflächlichen caninen Pyodermie sollten zudem auch topische Therapeutika zumindest als Therapiealternative oder Ergänzung in Betracht gezogen werden. Verwendung finden hier z.B. Shampoo-Zubereitungen mit Benzylperoxyd oder 2 bis 4%igem Chlorhexidin [289]. Studien konnten belegen, dass bei der oberflächlichen Pyodermie in vielen Fällen eine alleinige topische Therapie zum Erfolg führen kann [249, 290]. Auch bei der tiefen Pyodermie kann eine topische Therapie mit antibakteriellen Shampoos eine sinnvolle Unterstützung zur systemischen Antibiose sein, da sie neben den Bakterien auch andere Infektions- begünstigende Faktoren wie Krusten, Schuppen und Blutreste entfernt und damit eine Linderung des Juckreizes bewirkt [291]. Letztlich ist der Erfolg und die Praktikabilität jedoch im Einzelfall zu prüfen und hängt in erster Linie von der Akzeptanz des Hundes ab. Da Methicillin-resistente und Methicillin-sensible Staphylokokken keine Unterschiede in ihrer Sensibilität gegenüber Antiseptika wie Chlorhexidin zeigen, kann durch den topischen Einsatz dieser Wirkstoffe auch keine Selektion Methicillin-resistenter Stämme erfolgen [292]. Zudem sind Resistenzentwicklungen gegenüber antiseptischen Wirkstoffen in den bei topischer Applikation erreichten Konzentrationen vermutlich selten [293]. Eine Kombination von Chlorhexidin mit Tris-EDTA hat *in vitro* ein sehr breites Spektrum antimikrobieller Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie gegenüber *Malassezia spp.* gezeigt, und eignet sich daher auch sehr gut für die topische Behandlung von externen Otitiden [294]. Es wird davon ausgegangen, dass der rationale Einsatz von antiseptischen Topika einen positiven Effekt auf die Prävention von weiteren antimikrobiellen Resistenzen hat, da der Einsatz von systemischen Antiinfektiva vermieden und damit der Selektionsdruck auf die Bakterienpopulation gering gehalten wird [294].

Die Entwicklung von *S. (pseud)intermedius* vom opportunistischen Haut- und Schleimhautbesiedler, der insbesondere als Verursacher von Pyodermien und Otitiden bekannt ist, zum Erreger schwer therapierbarer (postoperativer) Wundinfektionen und möglichem neuen nosokomialen Problemkeim ist vermutlich auf die seit wenigen Jahren

auftretende Multiresistenz des Erregers zurückzuführen. Während MRSA in der Human- und Tiermedizin schon seit mehreren Dekaden auch als nosokomiale Problemkeime beobachtet werden, hat sich diese Entwicklung bei MRSP erst in den vergangenen fünf bis sechs Jahren zugespitzt und ist derzeit quasi in Echtzeit zu beobachten. Neben dem gezielten Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe, der auf einer bakteriellen Kultur und den Ergebnissen eines Antibiogramms fußt, ist auch ein spezielles Resistenz-Monitoring nosokomialer Erreger hilfreich und notwendig, um das Vorkommen multiresistenter Bakterien in Tierkliniken und auch Veränderungen im Resistenzverhalten dieser Erreger zu erfassen. Eine zusätzliche Erfassung der Anwendungsraten antimikrobieller Wirkstoffe zumindest in den stationären Bereichen von Tierkliniken könnte eine mögliche Korrelation zwischen dem Verbrauch dieser Wirkstoffe und der Entwicklung bakterieller Resistenzen frühzeitig aufdecken.

In allen untersuchten MRSP dieser Arbeit konnte PCR-basiert das Luk-I Operon sowie das für *Staphylococcus intermedius*-Exotoxin (SIET) kodierende Gen *siet* nachgewiesen werden. Frühere Studien haben *siet* meist nur in einem Teil der untersuchten Isolate nachgewiesen, vornehmlich in Isolaten von Hunden, die aus der Haut, aus Wundinfektionen sowie externen Otitiden isoliert wurden [158]. In dieser Arbeit konnten weder tierartliche, noch vorberichtliche oder geografische Zusammenhänge der Prävalenz Toxin-kodierender Gene festgestellt werden. Alle Stämme dieser Arbeit scheinen zumindest genetisch in der Lage, das Leukotoxin Luk-I sowie das Exotoxin SIET zu produzieren. Inwiefern diese Toxine jedoch in die Pathogenese der MRSP-Infektionen involviert sind, bleibt unklar. Der bloße Nachweis der zugrunde liegenden Gene kann keinen Aufschluss über die Genexpression geben, die möglicherweise Gewebe- oder Wirts- spezifische Abhängigkeiten zeigen kann.

## 6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die erhobenen Daten dieser Arbeit lassen einige Rückschlüsse über die Bedeutung und Verbreitung animaler MRSP in Europa zu und geben gleichsam Empfehlungen für das Design zukünftiger Studien.

Um die exakte Speziesidentifizierung von *S. pseudintermedius* mittels phänotypischer Verfahren wie z.B. der Testung der enzymatischen Aktivität von ADH und DNase zu validieren, sollten künftige Studien Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität dieser Testverfahren beinhalten. In diese Untersuchungen sollten sowohl MSSP als auch MRSP in größerer Anzahl integriert werden, sowie zuverlässige Kontrollstämme, deren Spezieszugehörigkeit DNA-sequenzbasiert nachgewiesen wurde. Für die routinemäßige Diagnostik von *S. pseudintermedius* sind kostengünstige und praktikable Verfahren erforderlich, die dennoch eine eindeutige Speziesidentifizierung erlauben.

Bei der Diagnostik der Methicillin-Resistenz animaler Staphylokokken sollte ein PCR-basierter Nachweis von *mecA* der phänotypischen Resistenztestung vorgezogen werden. Insbesondere Cefoxitin sollte zur Diagnostik von MRSP keine Verwendung finden, da es zu falsch negativen Ergebnissen und bei falscher Befundinterpretation zu Therapieversagen und vermeidbarem Leid der Patienten führt. Studien zur Prävalenz von MRSP sollten mit einheitlicher Diagnostik repräsentative Stichproben aus Kliniken in ganz Deutschland beinhalten, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Tierarten oder Vorberichten zu gewährleisten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf eine nosokomiale Problematik in der Tiermedizin verursacht durch MRSP, besonders bei Hunden mit der Indikation Wundinfektion. Eine gezielte Surveillance in klinischen Einrichtungen, die insbesondere bei Hunden im chirurgischen und intensivmedizinischen Bereich oder beim Vorhandensein weiterer Risikofaktoren (vorherige Antibiose, Vorbehandlung bzw. vorherige Vorstellung beim Haustierarzt oder in einer Klinik, Operationen innerhalb der letzten 30 Tage) ein Screening auf multiresistente Erreger veranlasst, kann weiteren Aufschluss über die nosokomiale Bedeutung von MRSP geben und sollte dringend initiiert werden. Auch ein Resistenzmonitoring nosokomialer Erreger wie MRSP, aber auch MRSA oder ESBL sollte in der Tiermedizin etabliert werden, um weitere Resistenzentwicklungen in veterinärpathogenen Erregern frühzeitig zu erkennen und ihnen entgegenwirken zu können.

Neben einem strikten, dokumentierten Hygieneregime in Kliniken und Tierarztpraxen muss sich vor allem im Problembewusstsein praktizierender Tierärzte im Bezug auf nosokomiale Infektionen ein Wandel vollziehen. Tierärzte müssen sich darüber im Klaren sein, dass mit dem unbedachten Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe die Entwicklung weiterer Resistenzen gefördert wird und damit das Auftreten bzw. die Selektion multiresistenter Bakterien in Kliniken und Praxen gefördert wird. Mangelhafte Händehygiene und eine unbemerkte

Kolonisation des Klinik- oder Praxispersonals mit multiresistenten Bakterien, ist zudem ein entscheidender Faktor bei der Entstehung nosokomialer Infektionen, was in Studium und Ausbildung ebenso wie in Fortbildungen und Schulungen verstärkt kommuniziert werden sollte. Dies ist aufgrund der vielfach dokumentierten Transmission multiresistenter Bakterien zwischen Tier und Mensch auch aus arbeitsschutzrechtlicher Sicht zum Schutz des Klinikpersonals entscheidend.

Unabhängig davon können die im letzten Jahrzehnt immer weiter optimierten molekularen Typisierungsmethoden für Bakterien auch im Falle von MRSP einen noch besseren Einblick in die globale Phylogenie dieses Erregers geben, und sowohl den Ursprung als auch die Verbreitung seiner Multiresistenz aufklären. Sobald eine vollständige Genom-Sequenz von *S. pseudintermedius* verfügbar und publiziert ist, sollte das MLST-Schema für *S. pseudintermedius* um weitere geeignete housekeeping-Gene erweitert werden bzw. die Genabschnitte von *agrD* und 16S rRNA gegen andere ersetzt werden. Auch die genaue Zusammensetzung der verschiedenen *SCCmec*-Varianten von MRSP sollte durch Sequenzierungen beleuchtet werden um auch einen Vergleich mit *SCCmec*-Elementen in MRSA ziehen zu können.

Der Nutzen der *spa*-Typisierung von MRSP als epidemiologisches Tool ist aufgrund des möglicherweise mehrfachen Vorhandenseins von *spa* im Genom von *S. pseudintermedius* fraglich. Feiner auflösendere Verfahren wie SNP-Analysen von vielen konservierten Loci des Genoms können möglicherweise besseren Aufschluss in die Evolution von MRSP geben. In weitere Untersuchungen sollten zudem auch MSSP in größerer Anzahl integriert werden, um die Evolution und Verbreitung der Methicillin-Resistenz nachvollziehen zu können.

## 7 Zusammenfassung

### „Molekulare Epidemiologie Methicillin-resistenter Staphylokokken der Intermedius-Gruppe“

Methicillin-resistente Staphylokokken haben seit einiger Zeit aufgrund ihrer zahlreichen Resistenzen gegenüber häufig verwendeten Antiinfektiva sowie ihrer steigenden Prävalenzen in der Tiermedizin an Bedeutung gewonnen. In der tiermedizinischen Praxis treten seit kurzem vermehrt Methicillin-resistente *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) auf, die den behandelnden Tierarzt aufgrund ihrer häufigen Multiresistenz vor große therapeutische Herausforderungen stellen. *S. pseudintermedius*, eine erst seit 2005 eigenständig anerkannte Spezies, wurde in der Vergangenheit häufig fälschlicherweise als *S. intermedius* identifiziert und hat sich auch in dieser Arbeit als klinisch bei Kleintieren, insbesondere Hunden, als bedeutendste Spezies der *Staphylococcus intermedius*-Gruppe (SIG) erwiesen. Neben Otitiden, Dermatitisen und Harnwegsinfektionen sind MRSP in dieser Arbeit auch als mögliche Erreger nosokomialer Wundinfektionen bei Kleintieren und auch Pferden identifiziert worden. Die Anwendung molekulargenetischer Typisierungsverfahren wie Multilocus Sequenztypisierung (MLST), *spa*-Typing und Pulsfeldgel-Elektrophorese (PFGE) konnte zeigen, dass klinische MRSP-Isolate insgesamt eine geringe Diversität zeigen. Diese initialen Daten deuten daraufhin, dass sich einzelne Genotyp-Linien in Deutschland und anderen europäischen Ländern weit verbreitet haben. Die PCR-basierte Typisierung des mobilen Resistenzelements *SCCmec* zeigt für den Großteil der Isolate homologe Ergebnisse und legt einen gemeinsamen Ursprung der Methicillin-Resistenz nahe. Phänotypische Resistenztestungen gegenüber einem breiten Spektrum gebräuchlicher Antiinfektiva konnten zudem für fast alle untersuchten MRSP eine außerordentlich umfangreiche Multiresistenz nachweisen, die die therapeutischen Optionen oft erheblich einschränkt. Systematische Surveillance und Infektions-Kontroll-Programme sind in der Tiermedizin dringend benötigt, um die Verbreitung multiresistenter Erreger wie MRSP nachvollziehen und geeignete Präventionsmaßnahmen entwickeln zu können.

## 8 Summary

### **„Molecular epidemiology of methicillin-resistant staphylococci of the intermedius group“**

During the last few years, methicillin-resistant staphylococci have gained in importance within veterinary medicine due to their vast resistance towards a wide range of frequently used antimicrobial agents and their increasing prevalence in veterinary medicine. In recent times, methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) is observed with increasing frequency in veterinary clinical facilities, often causing serious therapeutic challenges due to a common multiresistance. *S. pseudintermedius*, a species first described in 2005, was often confused with *S. intermedius* in the past and within this work it turned out to be the most important clinical species of the intermedius group in small animals, especially in dogs. Beside infections of the skin, ear and the urinary tract, MRSP of this work were also identified as a possible cause of nosocomial wound infections in small animals and in horses. Using molecular typing approaches like multilocus sequence typing (MLST), *spa*-Typing, and macrorestriction analysis via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), clinical MRSP isolates were shown to be of rather limited diversity. This initial data implies that certain genotypes are widely distributing in Germany and other European countries. PCR-based typing of the mobile genetic element *SCCmec* shows homologue results for most of the isolates, strongly indicating a common origin of methicillin-resistance. Furthermore, phenotypic resistance testing for a wide range of frequently used antimicrobials revealed a remarkable multiresistance of almost all isolates which substantially delimitates therapeutic options. Systematic surveillance and infection-control programs are urgently needed in veterinary medicine to retrace the spread of multiresistant pathogens like MRSP and to develop proper strategies for prevention.

## 9 Literatur

1. **Emori, T.G. and R.P. Gaynes** (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory  
*Clin Microbiol Rev*, **6**(4): p. 428-42.
2. **Crowe, M.J. and E.M. Cooke** (1998) Review of case definitions for nosocomial infection--towards a consensus. Presentation by the Nosocomial Infection Surveillance Unit (NISU) to the Hospital Infection Liaison Group, subcommittee of the Federation of Infection Societies (FIS). *J Hosp Infect.*, **39**(1): p. 3-11.
3. **Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene e.V.** (2007) Krank im Krankenhaus: Resistente Erreger – eine schleichende Gefahr für Mensch und Gesundheitssysteme, Ein Report der Allianz
4. **Beyersmann, J., et al.** (2008) Transmission-associated nosocomial infections: prolongation of intensive care unit stay and risk factor analysis using multistate models. *Am J Infect Control*, **36**(2): p. 98-103.
5. **Resch, A., M. Wilke and C. Fink** (2009) The cost of resistance: incremental cost of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in German hospitals  
*Eur J Health Econ*, **10**(3): p. 287-97.
6. **Gastmeier, P. et al.** (2005) Mortality in German intensive care units: dying from or with a nosocomial infection?  
*Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, **40**(5): p. 267-72.
7. **Witte, W. et al.** (2008) Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, **298**(5-6): p. 365-77.
8. **Nicoletti, G. and S. Stefani** (1995) *Enterococci*: susceptibility patterns and therapeutic options. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **14 Suppl 1**: p. S33-7.
9. **Rossolini, G.M. and E. Mantengoli** (2005) Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*  
*Clin Microbiol Infect*, **11 Suppl 4**: p. 17-32.
10. **Smith, T.L. et al.** (1999) Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus*  
*N Engl J Med*, **340**(7): p. 493-501.
11. **Walther, B. et al.** (2009) *Staphylococcus aureus* and MRSA colonization rates among personnel and dogs in a small animal hospital: association with nosocomial infections. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, **122**(5-6): p. 178-85.
12. **Ogeer-Gyles, J., K.A. Mathews and P. Boerlin** (2006) Nosocomial infections and antimicrobial resistance in critical care medicine  
*Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2006. **16**(1): p. 1-18.

13. **Johnson, J.A.**(2002) Nosocomial infections  
*Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **32**(5): p. 1101-26.
14. **Benveniste, R. and J. Davies** (1973) Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria  
*Annu Rev Biochem*, **42**: p. 471-506.
15. **Livermore, D.M.** (2000) Epidemiology of antibiotic resistance  
*Intensive Care Med*, **26 Suppl 1**: p. S14-21.
16. **Lipsitch, M. and M.H. Samore** (2002) Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis*, **8**(4): p. 347-54.
17. **Austin, D.J., M. Kakehashi and R.M. Anderson** (1997) The transmission dynamics of antibiotic-resistant bacteria: the relationship between resistance in commensal organisms and antibiotic consumption. *Proc Biol Sci*, **264**(1388): p. 1629-38.
18. **Kollef, M.H. et al.** (1999) Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* **115**(2): p. 462-74.
19. **Willemsen, I. et al.** (2009) Correlation between antibiotic use and resistance in a hospital: Temporary and ward-specific observations. *Infection*, **37**(5): p. 432-7.
20. **Snyder, G.M. et al.** (2008) Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on the gowns and gloves of healthcare workers  
*Infect Control Hosp Epidemiol*, **29**(7): p. 583-9.
21. **Kampf, G. et al.** (2003) Inducibility and potential role of *mecA*-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. *J Hosp Infect*, **54**(2): p. 124-9.
22. **Fridkin, S.K.** (2001) Increasing prevalence of antimicrobial resistance in intensive care units. *Crit Care Med*, **29**(4 Suppl): p. N64-8.
23. **Lorente, C., Y. Del Castillo and J. Rello** (2002) Prevention of infection in the intensive care unit: current advances and opportunities for the future  
*Curr Opin Crit Care*, **8**(5): p. 461-4.
24. **Baughman, R.P.** (2002) Antibiotic resistance in the intensive care unit  
*Curr Opin Crit Care*. **8**(5): p. 430-4.
25. **Mielke, M and Wischnewski, N** (2004) Nosokomiale Infektionen, in: **Suttorp, N. et al.** Infektionskrankheiten: Verstehen, erkennen, behandeln. Georg Thieme Verlag, p. 626-643
26. **Willems, R.J. and W. van Schaik** (2009) Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol*, **4**: p. 1125-35.
27. **Ziebuhr, W.** (2001) *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contrib Microbiol*. **8**: p. 102-7.

28. **Ibarra, M. et al.** (2008) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in healthcare workers. *Pediatr Infect Dis J*, **27**(12): p. 1109-111.
29. **Wenzel, R.P.** (1994) Healthcare workers and the incidence of nosocomial infection: can treatment of one influence the other?-a brief review  
*J Chemother*, **6 Suppl 4**: p. 33-7; discussion 39-40.
30. **Weist, K. et al.** (2002) How many nosocomial infections are associated with cross-transmission? A prospective cohort study in a surgical intensive care unit  
*Infect Control Hosp Epidemiol.*, **23**(3): p. 127-32.
31. **Koopmans, M.** (2009) Noroviruses in healthcare settings: a challenging problem.  
*J Hosp Infect*, **73**(4): p. 331-7.
32. **Samore, M.H.** (1993) Epidemiology of nosocomial *Clostridium difficile* infection.  
*Compr Ther*, **19**(4): p. 151-6.
33. **Richards, M.J. et al.** (1999) Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System  
*Crit Care Med*, **27**(5): p. 887-92.
34. **Safdar, N. and D.G. Maki** (2002) The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, enterococcus, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*  
*Ann Intern Med*, **136**(11): p. 834-44.
35. **Girou, E. et al.** (1998) Risk factors and outcome of nosocomial infections: results of a matched case-control study of ICU patients.  
*Am J Respir Crit Care Med*, **157**(4 Pt 1): p. 1151-8.
36. **Francey, T. et al.** (2000) The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit  
*J Vet Intern Med*, **14**(2): p. 177-83.
37. **Weese, J.S. et al.** (2007) Cluster of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a small animal intensive care unit  
*J Am Vet Med Assoc*, **231**(9): p. 1361-4.
38. **Prescott, J.F. et al.** (2002) Antimicrobial drug use and resistance in dogs  
*Can Vet J*, 2002. **43**(2): p. 107-16.
39. **Cohn, L.A. et al.** (2003) Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *J Vet Diagn Invest*, **15**(4): p. 338-43.
40. **Cooke, C.L. et al.** (2002) Enrofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs with urinary tract infections. *J Am Vet Med Assoc*, **220**(2): p. 190-2.
41. **Boerlin, P. et al.**, (2001) Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol*, **82**(4): p. 347-59.

42. **Ogeer-Gyles, J. et al.** (2006) Development of antimicrobial drug resistance in rectal *Escherichia coli* isolates from dogs hospitalized in an intensive care unit *J Am Vet Med Assoc*, **229**(5): p. 694-9.
43. **Bagcigil, F.A. et al.** (2007) Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin-and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. *Vet Microbiol*, **121**(3-4): p. 307-15.
44. **Greene, C.** (2006) Nosocomial Infections. In: Greene, CE (ed): Infectious diseases of the dog and cat. WB Saunders Elsevier, Philadelphia, p.997-1007
45. **Sidhu, M.S. et al.** (2007) Persistence of multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an animal veterinary teaching hospital clinic *Microb Drug Resist*, **13**(4): p. 271-80.
46. **Seguin, J.C. et al.** (1999) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission *J Clin Microbiol*, **37**(5): p. 1459-63.
47. **Weese, J.S. and S.L. Lefebvre** (2007) Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in horses admitted to a veterinary teaching hospital. *Can Vet J*, **48**(9): p. 921-6.
48. **Zubeir, I.E. et al.** (2007) Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations *Vet Microbiol*, **121**(1-2): p. 170-6.
49. **Weese, J.S.** (2008) A review of multidrug resistant surgical site infections *Vet Comp Orthop Traumatol*, **21**(1): p. 1-7.
50. **Leonard, F.C. et al.** (2006) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a veterinary surgeon and five dogs in one practice. *Vet Rec.*, **158**(5): p. 155-9.
51. **Vanechoutte, M. et al.** (2000) *Acinetobacter baumannii*-infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic. *J Clin Microbiol*, **38**(11): p. 4280-1.
52. **Smarick, S.D. et al.** (2004) Incidence of catheter-associated urinary tract infection among dogs in a small animal intensive care unit *J Am Vet Med Assoc*, **224**(12): p. 1936-40.
53. **Marsh-Ng, M.L., D.P. Burney and J. Garcia** (2007) Surveillance of infections associated with intravenous catheters in dogs and cats in an intensive care unit *J Am Anim Hosp Assoc*, **43**(1): p. 13-20.
54. **Ogeer-Gyles, J. et al.** (2006) Evaluation of catheter-associated urinary tract infections and multi-drug-resistant *Escherichia coli* isolates from the urine of dogs with indwelling urinary catheters. *J Am Vet Med Assoc*, **229**(10): p. 1584-90.

55. **Weese, J.S. and J. Armstrong** (2003) Outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease in a small animal veterinary teaching hospital  
*J Vet Intern Med*, **17**(6): p. 813-6.
56. **Tillotson, K. et al.** (1997) Outbreak of *Salmonella infantis* infection in a large animal veterinary teaching hospital. *J Am Vet Med Assoc*, **211**(12): p. 1554-7.
57. **Baker, J.R.** (1969) An outbreak of salmonellosis involving veterinary hospital patients. *Vet Rec*, **85**(1): p. 8-10.
58. **Carter, J.D. et al.** (1986) Salmonellosis in hospitalized horses: seasonality and case fatality rates. *J Am Vet Med Assoc*, **188**(2): p. 163-7.
59. **Kawakami, K. et al.** (2010) A Nosocomial Outbreak of Serious Canine Infectious Tracheobronchitis (Kennel Cough) caused by Canine Herpesvirus Infection  
*J Clin Microbiol*, **48**(4):p. 1176-81
60. **Jones, I.D. et al.** (2009) Factors contributing to the contamination of peripheral intravenous catheters in dogs and cats. *Vet Rec*, **164**(20): p. 616-8.
61. **Burrows, C.F.** (1982) Inadequate skin preparation as a cause of intravenous catheter-related infection in the dog. *J Am Vet Med Assoc*, **180**(7): p. 747-9.
62. **Lippert, A.C., R.B. Fulton and A.M. Parr** (1988) Nosocomial infection surveillance in a small animal intensive care unit  
*J Am Anim Hosp Assoc*, **24**: p. 627-36.
63. **Maki, D.G. et al.** (1997) Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter. A randomized, controlled trial.  
*Ann Intern Med*, **127**(4): p. 257-66.
64. **Khare, M.D. et al.,** (2007) Reduction of catheter-related colonisation by the use of a silver zeolite-impregnated central vascular catheter in adult critical care  
*J Infect*, **54**(2): p. 146-50.
65. **Crnich, C.J. and D.G. Maki** (2004) Are antimicrobial-impregnated catheters effective? Don't throw out the baby with the bathwater  
*Clin Infect Dis*, **38**(9): p. 1287-92.
66. **Goldmann, D.A. and G.B. Pier** (1993) Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol Rev*, **6**(2): p. 176-92.
67. **Hohenhaus, A.E., L.M. Drusin and M.S. Garvey** (1997) *Serratia marcescens* contamination of feline whole blood in a hospital blood bank  
*J Am Vet Med Assoc*, **210**(6): p. 794-8.
68. **Heldmann, E., D.C. Brown and F. Shofer** (1999) The association of propofol usage with postoperative wound infection rate in clean wounds: a retrospective study  
*Vet Surg*, **28**(4): p. 256-9.

69. **Bennett, S.N. et al.** (1995) Postoperative infections traced to contamination of an intravenous anesthetic, propofol. *N Engl J Med*, **333**(3): p. 147-54.
70. **Biertuempfel, P.H., G.V. Ling and G.A. Ling** (1981) Urinary tract infection resulting from catheterization in healthy adult dogs  
*J Am Vet Med Assoc*, **178**(9): p. 989-91.
71. **Wise, L.A., R.L. Jones and J.S. Reif** (1990) Nosocomial canine urinary tract infections in a veterinary teaching hospital (1983-1988)  
*J Am Anim Hosp Assoc*, **26**: p. 148-52.
72. **Barsanti, J.A., J. Blue and J. Edmunds** (1985) Urinary tract infection due to indwelling bladder catheters in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, **187**(4): p. 384-8.
73. **Glickman, L.T.** (1981) Veterinary nosocomial (hospital-acquired) *Klebsiella* infections. *J Am Vet Med Assoc*, **179**(12): p. 1389-92.
74. **Donlan, R.M.** (2002) Biofilms: microbial life on surfaces  
*Emerg Infect Dis*, **8**(9): p. 881-90.
75. **Vasseur, P.B. et al.** (1988) Surgical wound infection rates in dogs and cats. Data from a teaching hospital. *Vet Surg*, **17**(2): p. 60-4.
76. **Romatowski, J.** (1989) Prevention and control of surgical wound infection  
*J Am Vet Med Assoc*, **194**(1): p. 107-14.
77. **Vasseur, P.B. et al.** (1985) Infection rates in clean surgical procedures: a comparison of ampicillin prophylaxis vs. a placebo. *J Am Vet Med Assoc*, **187**(8): p. 825-7.
78. **Howorth, F.H.**, (1985) Prevention of airborne infection during surgery  
*Lancet*, **1**(8425): p. 386-8.
79. **Howorth, F.H.** (1986) Prevention of airborne infections in operating rooms  
*Hosp Eng*, **40**(8): p. 17-23.
80. **Sturgeon, C. et al.** (2000) Bacterial contamination of suction tips used during surgical procedures performed on dogs and cats. *Am J Vet Res*, **61**(7): p. 779-83.
81. **Eugster, S. et al.** (2004) A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats. *Vet Surg*, **33**(5): p. 542-50.
82. **Brown, D.C. et al.** (1997) Epidemiologic evaluation of postoperative wound infections in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, **210**(9): p. 1302-6.
83. **Nicholson, M., et al.** (2002) Epidemiologic evaluation of postoperative wound infection in clean-contaminated wounds: A retrospective study of 239 dogs and cats. *Vet Surg*, **31**(6): p. 577-81.
84. **Hamilton, H.W., K.R. Hamilton and F.J. Lone** (1977) Preoperative hair removal.  
*Can J Surg*, **20**(3): p. 269-71,274-5.

85. **Beal, M.W., D.C. Brown and F.S. Shofer** (2000) The effects of perioperative hypothermia and the duration of anesthesia on postoperative wound infection rate in clean wounds: a retrospective study. *Vet Surg*, **29**(2): p. 123-7.
86. **Suzuki, A. et al.** (1984) Airborne contamination in an operating suite: report of a five-year survey. *J Hyg (Lond)*, **93**(3): p. 567-73.
87. **Whittem, T.L. et al.** (1999) Effect of perioperative prophylactic antimicrobial treatment in dogs undergoing elective orthopedic surgery  
*J Am Vet Med Assoc*, **215**(2): p. 212-6.
88. **Cross, A.S. and B. Roup** (1981) Role of respiratory assistance devices in endemic nosocomial pneumonia. *Am J Med*, **70**(3): p. 681-5.
89. **Joshi, N., A.R. Localio and B.H. Hamory** (1992) A predictive risk index for nosocomial pneumonia in the intensive care unit. *Am J Med*, **93**(2): p. 135-42.
90. **Craven, D.E. and K.A. Steger** (1998) Ventilator-associated bacterial pneumonia: challenges in diagnosis, treatment, and prevention. *New Horiz*, **6**(2 Suppl): p. S30-45.
91. **Garrouste-Orgeas, M. et al.** (1997) Oropharyngeal or gastric colonization and nosocomial pneumonia in adult intensive care unit patients. A prospective study based on genomic DNA analysis. *Am J Respir Crit Care Med*, **156**(5): p. 1647-55.
92. **Fluit, A.C., F.J. Schmitz and J. Verhoef** (2001) Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients  
*Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **20**(3): p. 188-91.
93. **Trouillet, J.L. et al.** (1998) Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med*, **157**(2): p. 531-9.
94. **Gastmeier, P. et al.** (2005) Mortality risk factors with nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in intensive care units: results from the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS). *Infection*, **33**(2): p. 50-5.
95. **Craven, D.E. et al.** (1992) Nosocomial pneumonia: epidemiology and infection control. *Intensive Care Med*, **18 Suppl 1**: p. S3-9.
96. **Schott, H.C., 2nd et al.** (2001) An outbreak of salmonellosis among horses at a veterinary teaching hospital. *J Am Vet Med Assoc*, **218**(7): p. 1152-9, 1100.
97. **Madewell, B.R. et al.** (1995) Apparent outbreaks of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in horses in a veterinary medical teaching hospital  
*J Vet Diagn Invest*, **7**(3): p. 343-6.
98. **Kruth, S.A. et al.** (1989) Nosocomial diarrhea associated with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, **195**(3): p. 331-4.

99. **Ketaren, K. et al.** (1981) Canine salmonellosis in a small animal hospital  
*J Am Vet Med Assoc*, **179**(10): p. 1017-8.
100. **Timoney, J.F., H.C. Neibert and F.W. Scott** (1978) Feline salmonellosis. A nosocomial outbreak and experimental studies. *Cornell Vet*, **68**(2): p. 211-9.
101. **Struble, A.L. et al.** (1994) Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital.  
*J Vet Diagn Invest*, **6**(3): p. 342-7.
102. **Morse, E.V. and M.A. Duncan** (1975) Canine salmonellosis: prevalence, epizootiology, signs, and public health significance  
*J Am Vet Med Assoc*, **167**(9): p. 817-20.
103. **Riley, T.V. et al.** (1991) Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiol Infect*, **107**(3): p. 659-65.
104. **Uhaa, I.J. et al.** (1988) Case-control study of risk factors associated with nosocomial *Salmonella krefeld* infection in dogs. *Am J Vet Res*, **49**(9): p. 1501-5.
105. **Konkle, D.M., K.M. Nelson and D.P. Lunn** (1997) Nosocomial transmission of *Cryptosporidium* in a veterinary hospital. *J Vet Intern Med*, **11**(6): p. 340-3.
106. **Bannermann, T. and S. Peacock** (2007) *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci, in Manual of Clinical Microbiology, M. PR, et al., Editors ASM Press: Washington DC. pp. 390-412.
107. **Peacock, S.** (2005) In: S.P. Borriello, P.R. Murray and G. Funke (ed.), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Hodder Arnold, London, United Kingdom, **10th ed.**
108. **Kloos, W.E.** (1980) Natural populations of the genus *Staphylococcus*  
*Annu Rev Microbiol*, **34**: p. 559-92.
109. **Werckenthin, C. et al.** (2001) Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*  
*Vet Res*, **32**(3-4): p. 341-62.
110. **Selbitz, H.J.** (2001) Staphylokokkeninfektionen von Hund und Katze. In: A. Rolle und A. Mayr (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke, Stuttgart, 7. Aufl., p. 510-511.
111. **Hesselbarth, J. and S. Schwarz** (1995) Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. *Vet Microbiol*, **45**(1): p. 11-7.
112. **Aarestrup, F.M.** (2001) Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the Canoidea gives possible evidence for host-specificity and co-evolution of bacteria and hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**(Pt 4): p. 1343-7.

113. **Chesneau, O., et al.** (2000) The value of rRNA gene restriction site polymorphism analysis for delineating taxa in the genus *Staphylococcus*  
*Int J Syst Evol Microbiol*, **50 Pt 2**: p. 689-97.
114. **Bes, M. et al.** (2002) Population diversity of *Staphylococcus intermedius* isolates from various host species: typing by 16S-23S intergenic ribosomal DNA spacer polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, **40**(6): p. 2275-7.
115. **Hesselbarth, J. et al.** (1994) Characterization of *Staphylococcus intermedius* from healthy dogs and cases of superficial pyoderma by DNA restriction endonuclease patterns. *Vet Microbiol*, **41**(3): p. 259-66.
116. **Devriese, L.A. et al.** (2005) *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**(Pt 4): p. 1569-73.
117. **Sasaki, T. et al.** (2007) Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **45**(9): p. 2770-8.
118. **Bannoehr, J. et al.** (2007) Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J. Bacteriol.*, **189**(23): p. 8685-92.
119. **Bjorland, J. et al.** (2005) Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway  
*J Clin Microbiol*, **43**(9): p. 4363-8.
120. **Devriese, L.A. et al.** (2009) *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Vet Microbiol*, **133**(1-2): p. 206-7.
121. **Bannoehr, J. et al.** (2009) Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol*, **47**(2): p. 469-71.
122. **Sasaki, T. et al.** (2009) Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol*, **48**(3): p. 765-9
123. **Van Hoovels, L. et al.** (2006) First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J. Clin. Microbiol.* **44**(12): p. 4609-12.
124. **Medleau, L., et al.** (1986) Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas  
*Am J Vet Res*, **47**(2): p. 229-31.
125. **Cox, H.U. et al.** (1988) Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs.  
*Am. J. Vet. Res.*, **49**(6): p. 747-51.
126. **Allaker, R.P., D.H. Lloyd and R.M. Bailey** (1992) Population sizes and frequency of staphylococci at mucocutaneous sites on healthy dogs. *Vet Rec*, **130**(14): p. 303-4.

127. **Talan, D.A. et al.** (1989) *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. *J Clin Microbiol*, **27**(1): p. 78-81.
128. **Fazakerley, J. et al.** (2009) Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol*, **20**(3): p. 179-84.
129. **Lilenbaum, W., E.L. Nunes and M.A. Azeredo** (1998) Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. *Lett Appl Microbiol*, **27**(4): p. 224-8.
130. **Allaker, R.P., D.H. Lloyd and A.I. Simpson** (1992) Occurrence of *Staphylococcus intermedius* on the hair and skin of normal dogs. *Res Vet Sci*, **52**(2): p. 174-6.
131. **Gross, T., P. Ihrke and E. Walder** (2005) *Skin Diseases of the Dog and the Cat*. Ames, IA: Blackwell Science, p. 406-10.
132. **Penna, B. et al.** (2009) Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet Dermatol*, **21**(3): p. 292-6.
133. **Mahoudeau, I. et al.** (1997) Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. *J Clin Microbiol*, **35**(8): p. 2153-4.
134. **Hanselman, B.A. et al.** (2009) Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Can Vet J*, **50**(9): p. 954-8.
135. **Goodacre, R. et al.** (1997) An epidemiological study of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs, their owners and veterinary surgeons *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **44**: p. 49-64.
136. **Harvey, R.G., Marples, R. R. & Noble, W. C.** (1994) Nasal carriage of *Staphylococcus intermedius* in humans in contact with dogs *Microbial Ecology in Health and Disease*, **7**: p. 225-7.
137. **Barnham, M. and B. Holmes** (1992) Isolation of CDC group M-5 and *Staphylococcus intermedius* from infected dog bites. *J Infect*, **25**(3): p. 332-4.
138. **Lee, J.** (1994) *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds *J Infect*, **29**(1): p. 105.
139. **Gerstadt, K. et al.** (1999) Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass grafting. *Clin Infect Dis*, **29**(1): p. 218-9.
140. **Vandenesch, F. et al.** (1995) Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*. *J Clin Microbiol*, **33**(9): p. 2508-10.
141. **Llorca, I. et al.** (1992) Infectious endocarditis caused by *Staphylococcus intermedius* in a patient infected with HIV. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **10**(5): p. 317-8.

142. **Tanner, M.A., C.L. Everett and D.C. Youvan** (2000) Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J Clin Microbiol*, **38**(4): p. 1628-31.
143. **Guardabassi, L., M.E. Loeber and A. Jacobson** (2004) Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Vet Microbiol*, **98**(1): p. 23-7.
144. **Talan, D.A. et al.** (1989) Frequency of *Staphylococcus intermedius* as human nasopharyngeal flora. *J Clin Microbiol*, **27**(10): p. 2393.
145. **Vincze, S. et al.** (2010) Multidrug- and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as a cause of canine pyoderma: A case report  
Fallbericht: Methicillin- und multiresistente *Staphylococcus pseudintermedius* als Ursache einer caninen Pyodermie.  
*Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, accepted article in press
146. **Dinges, M.M., P.M. Orwin, and P.M. Schlievert** (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, **13**(1): p. 16-34, table of contents.
147. **Koenig, M.G.** (1962) Factors relating to the virulence of staphylococci. I. Comparative studies on two colonial variants. *Yale J Biol Med*, **34**: p. 537-59.
148. **Novick, R.P.** (2000) Pathogenicity factors and their regulation. In V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), *Gram-positive pathogens*. American Society for Microbiology, Washington D.C., p. p. 392–407.
149. **Geoghegan, J.A. et al.** (2009) *Staphylococcus pseudintermedius* expresses surface proteins that closely resemble those from *Staphylococcus aureus*  
*Vet Microbiol*, **138** (3-4):p. 345-52
150. **Simou, C. et al.** (2005) Species specificity in the adherence of staphylococci to canine and human corneocytes: a preliminary study. *Vet Dermatol*, **16**(3): p. 156-61.
151. **Edwards, V.M. et al.** (1997) Characterization of the canine type C enterotoxin produced by *Staphylococcus intermedius* pyoderma isolates  
*Infect Immun*, **65**(6): p. 2346-52.
152. **Becker, K. et al.** Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*  
*Appl Environ Microbiol*, **67**(12): p. 5551-7.
153. **Hendricks, A. et al.** (2002) Frequency of superantigen-producing *Staphylococcus intermedius* isolates from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of superantigens in dogs. *Res Vet Sci*, **73**(3): p. 273-7.
154. **Futagawa-Saito, K. et al.** (2004) Identification and prevalence of an enterotoxin-related gene, se-int, in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons  
*J Appl Microbiol*, **96**(6): p. 1361-6.

155. **Khambaty, F.M., R.W. Bennett and D.B. Shah** (1994) Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol Infect*, **113**(1): p. 75-81.
156. **Dohlsten, M., G. Hedlund and T. Kalland** (1991) Staphylococcal-enterotoxin-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today*, **12**(5): p. 147-50.
157. **Moodley, A. et al.** (2009) Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (spa) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* *Vet. Microbiol.*, **135**(3-4): p. 320-6.
158. **Lautz, S. et al.** (2006) Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **53**(9): p. 434-8.
159. **Kaneko, J. and Y. Kamio** (2004) Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**(5): p. 981-1003.
160. **Lina, G. et al.** (1999) Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia *Clin Infect Dis*, **29**(5): p. 1128-32.
161. **Futagawa-Saito, K. et al.** (2004) Prevalence and characterization of leukotoxin-producing *Staphylococcus intermedius* in isolates from dogs and pigeons *J. Clin. Microbiol.* **42**(11): p. 5324-6.
162. **Futagawa-Saito, K. et al.** (2009) Identification of first exfoliative toxin in *Staphylococcus pseudintermedius*. *FEMS Microbiol Lett*
163. **Allaker, R. et al.** (1991) Production of 'virulence factors' by *Staphylococcus intermedius* isolates from cases of canine pyoderma and healthy carriers *Microbial Ecology in Health and Disease*, **4**(3): p. 169-173.
164. **Dziewanowska, K. et al.** (1996) Comparison of the beta-toxins from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Arch Biochem Biophys*, **335**(1): p. 102-8.
165. **Futagawa-Saito, K. et al.** (2006) Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *BMC Vet Res*, **2**: p. 4.
166. **Boyen, F. et al.** (2009) Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Vet Microbiol*, **135**(3-4): p. 187-95.
167. **Novick, R.P. et al.** (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo J*, **12**(10): p. 3967-75.
168. **Novick, R.P. and E. Geisinger** (2008) Quorum sensing in staphylococci *Annu Rev Genet*, **42**: p. 541-64.

169. **Arvidson, S. and K. Tegmark** (2001) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, **291**(2): p. 159-70.
170. **Sung, J.M., P.D. Chantler and D.H. Lloyd** (2006) Accessory gene regulator locus of *Staphylococcus intermedius*. *Infect Immun*, **74**(5): p. 2947-56.
171. **Dufour, P. et al.** (2002) High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol*, **184**(4): p. 1180-6.
172. **Lyon, G.J. and R.P. Novick** (2004) Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* **25**(9): p. 1389-403.
173. **Ji, G., R. Beavis and R.P. Novick** (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, **276**(5321): p. 2027-30.
174. **Ji, G. et al.** (2005) *Staphylococcus intermedius* produces a functional *agr* autoinducing peptide containing a cyclic lactone. *J Bacteriol*, **187**(9): p. 3139-50.
175. **Jarraud, S. et al.** (2002) Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease *Infect Immun*, **70**(2): p. 631-41.
176. **Gillet, Y. et al.** (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, **359**(9308): p. 753-9.
177. **Jarraud, S. et al.** (2000) Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **182**(22): p. 6517-22.
178. **Lambert, P.A. and P. Gilbert** (2002) Antibiotics that act on the cell wall and membrane. *Molecular Medical Microbiology*, **1**: p. 591-593.
179. **Rosdahl, V.T. and K. Rosendal** (1983) Correlation of penicillinase production with phage type and susceptibility to antibiotics and heavy metals in *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, **16**(4): p. 391-9.
180. **Geiss H., M.D., Seifert H.** (2004) Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und Interpretation von Ergebnissen der Antibiotika-Empfindlichkeitstestung bei grampositiven und gramnegativen Erregern. *Chemotherapie Journal*, **13**(1): p. 1-16.
181. **Zygmunt, D.J., C.W. Stratton and D.S. Kernodle** (1992) Characterization of four beta-lactamases produced by *Staphylococcus aureus* *Antimicrob Agents Chemother*, **36**(2): p. 440-5.
182. **Rowland, S.J. and K.G. Dyke** (1989) Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. *Embo J*, **8**(9): p. 2761-73.
183. **Lyon, B.R. and R. Skurray** (1987) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev*, **51**(1): p. 88-134.

184. **Yazdankhah, S.P., H. Sorum and H. Oppegaard** (2000) Comparison of genes involved in penicillin resistance in staphylococci of bovine origin *Microb Drug Resist*, **6**(1): p. 29-36.
185. **Barber, M.** (1961) Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol*, **14**: p. 385-93.
186. **Chambers, H.F.** (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, **10**(4): p. 781-91.
187. **Pinho, M.G. et al.** (2001) Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **183**(22): p. 6525-31.
188. **Brown, D.F.** (2001) Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci *J Antimicrob Chemother*, **48 Suppl 1**: p. 65-70.
189. **Tomasz, A., S. Nachman and H. Leaf** (1991) Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci *Antimicrob Agents Chemother*, **35**(1): p. 124-9.
190. **Barrett, J.F.** (2005) MRSA--what is it, and how do we deal with the problem? *Expert Opin Ther Targets*, **9**(2): p. 253-65.
191. **Ito, T. and K. Hiramatsu** (1998) Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J*, **39**(6): p. 526-33.
192. **Hiramatsu, K. et al.** (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, **9**(10): p. 486-93.
193. **Hackbarth, C.J. and H.F. Chambers** (1993) *blaI* and *blaR1* regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *Antimicrob Agents Chemother*, **37**(5): p. 1144-9.
194. **Gregory, P.D. et al.** (1997) Studies of the repressor (*blaI*) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **24**(5): p. 1025-37.
195. **McKinney, T.K. et al.** (2001) Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and beta-lactamase regulators. *J Bacteriol*, **183**(23): p. 6862-8.
196. **Ryffel, C., F.H. Kayser and B. Berger-Bachi** (1992) Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*, **36**(1): p. 25-31.
197. **Ito, T. et al.** (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Updat.*, **6**(1): p. 41-52.

198. **Shore, A. et al.** (2005) Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**(5): p. 2070-83.
199. **Katayama, Y., T. Ito and K. Hiramatsu,** (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**(6): p. 1549-55.
200. **Ito, T. et al.** (2004) Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**(7): p. 2637-51.
201. **Descloux, S., A. Rossano and V. Perreten** (2008) Characterization of new staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Clin. Microbiol.*, **46**(5): p. 1818-23.
202. **Ito, T. et al.** (2001) Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**(5): p. 1323-36.
203. **Black, C.C. et al.** (2009) Identification of a predominant multilocus sequence type, pulsed-field gel electrophoresis cluster, and novel staphylococcal chromosomal cassette in clinical isolates of *mecA*-containing, methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet. Microbiol.*
204. **Berglund, C. et al.** (2008) Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**(10): p. 3512-6.
205. **Clinical And Laboratory Standards Institute** (2008) Detection of methicillin resistant staphylococci, 3rd ed., approved standard M31-A3. CLSI, Wayne, PA
206. **Piriz, S. et al.** (1996) In vitro activity of fifteen antimicrobial agents against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus intermedius*. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **19**(2): p. 118-23.
207. **Gortel, K. et al.,** (1999) Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **60**(12): p. 1526-30.
208. **Lilenbaum, W., A.L. Esteves and G.N. Souza** (1999) Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats. *Lett Appl Microbiol*, **28**(6): p. 448-52.
209. **Murchan, S. et al.** (2003) Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* **41**(4): p. 1574-85.

210. **Melles, D.C. et al.** (2007) Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus* *J Microbiol Methods*, **69**(2): p. 371-5.
211. **Hallin, M. et al.** (2007) Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa*-typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol*, **45**(1): p. 127-33.
212. **Tenover, F.C. et al.** (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing *J Clin Microbiol*, **33**(9): p. 2233-9.
213. **Smith, T.C. et al.** (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers *PLoS One*, **4**(1): p. e4258.
214. **Huijsdens, X.W. et al.** (2009) Molecular characterisation of PFGE non-typable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in The Netherlands *Euro Surveill*, **14**(38).
215. **Soedarmanto, I. et al.** (1996) Identification and molecular characterization of serological group C streptococci isolated from diseased pigs and monkeys in Indonesia. *J. Clin. Microbiol.*, **34**(9): p. 2201-4.
216. **Maiden, M.C. et al.** (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**(6): p. 3140-5.
217. **Enright, M.C. et al.** (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* *J Clin Microbiol*, **38**(3): p. 1008-15.
218. **Struelens, M.J. et al.** (2009) Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect*, **15**(2): p. 112-9.
219. **Enright, M.C. et al.** (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**(11): p. 7687-92.
220. **Guss, B. et al.** (1984) Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur J Biochem*, **138**(2): p. 413-20.
221. **Frenay, H.M. et al.** (1994) Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol*, **32**(3): p. 846-7.
222. **Feil, E.J. et al.** (2003) How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol*, **185**(11): p. 3307-16.

223. **Harmsen, D. et al.** (2003) Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol*, **41**(12): p. 5442-8.
224. **Oliveira, D.C., A. Tomasz and H. de Lencastre** (2001) The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements  
*Microb Drug Resist*, **7**(4): p. 349-61.
225. **Oliveira, D.C., A. Tomasz and H. de Lencastre** (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis*, **2**(3): p. 180-9.
226. **Crisostomo, M.I. et al.** (2001) The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**(17): p. 9865-70.
227. **van Duijkeren, E. et al.** (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: An investigation of several outbreaks  
*Vet Microbiol*, **141**(1-2):96-102.
228. **Perreten, V. et al.** (2010) Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study  
*J Antimicrob Chemother*, **65**(6): p. 1145-54.
229. **Chongtrakool, P. et al.** (2006) Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements  
*Antimicrob. Agents. Chemother.* **50**(3): p. 1001-12.
230. **Oliveira, D.C. et al.** (2006) Assessment of allelic variation in the *ccrAB* locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones  
*J Antimicrob Chemother*, **58**(1): p. 23-30.
231. **Oliveira, D.C., C. Milheirico and H. de Lencastre** (2006) Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI  
*Antimicrob Agents Chemother*, **50**(10): p. 3457-9.
232. **Lim, T.T., G.W. Coombs and W.B. Grubb** (2002) Genetic organization of *mecA* and *mecA*-regulatory genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australia and England. *J Antimicrob Chemother*, **50**(6): p. 819-24.
233. **Nübel, U. et al.** (2008) Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(37): p. 14130-5.

234. **Cookson, B.D. et al.** (2007) Evaluation of Molecular Typing Methods in Characterizing a European Collection of Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) - the HARMONY collection *J Clin Microbiol*, **45**(6):1830-7.
235. **Zhang, K. et al.** (2005) Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **43**(10): p. 5026-33.
236. **Oliveira, D.C. and H. de Lencastre** (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**(7): p. 2155-61.
237. **Sasaki, T. et al.** (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.*, **45**(4): p. 1118-25.
238. **Weese, J.S. and E. van Duijkeren**, (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine *Vet. Microbiol.*, **140** (3-4): p. 418-29
239. **Bemis, D.A., R.D. Jones and S.A. Kania** (2008) Evaluation of interpretive breakpoint recommendations for detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs in the United States. *Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens*, C141
240. **Weese, J.S. et al.** (2009) Infection with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* masquerading as cefoxitin susceptible in a dog *J Am Vet Med Assoc*, **235**(9): p. 1064-6.
241. **Epstein, C.R. et al.** (2009) Methicillin-resistant commensal staphylococci in healthy dogs as a potential zoonotic reservoir for community-acquired antibiotic resistance. *Infect Genet Evol*, **9**(2): p. 283-5.
242. **Rachal, T. et al.** (2009) Prevalence of SCC*mec* types in methicillin resistant *Staphylococcus intermedius* in healthy pets from Southeastern United States *J Infect Dis Immun*, **1**: p. 006-010.
243. **Kania, S.A. et al.** (2004) Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. *Am J Vet Res*, **65**(9): p. 1265-8.
244. **Morris, D.O. et al.** (2006) Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Vet. Dermatol.* **17**(5): p. 332-7.
245. **Ward, M.P. et al.** (2003) Development, implementation and assessment of a surveillance system for nosocomial infections in a veterinary teaching hospital. *Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*

- 
246. **Boost, M.V., M. O'Donoghue M and K.H. Siu** (2007) Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from dogs and their owners. *Clin Microbiol Infect*, **13**(7): p. 731-33
247. **van Duijkeren, E. et al.** (2008) Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. *Vet Microbiol*, **128**(1-2): p. 213-5.
248. **Degener, J.E. et al.** (1994) Nosocomial infection by *Staphylococcus haemolyticus* and typing methods for epidemiological study. *J Clin Microbiol*, **32**(9): p. 2260-5.
249. **Loeffler, A. et al.** (2007) First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Vet. Dermatol.*, **18**(6): p. 412-21.
250. **Norström, M. et al.** (2009) Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* in the Norwegian Dog Population *Microb. Drug Resist.* **15**(1): 55-59
251. **Alonso-Echanove, J. et al.** (2003) Effect of nurse staffing and antimicrobial-impregnated central venous catheters on the risk for bloodstream infections in intensive care units. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **24**(12): p. 916-25.
252. **Katz, J.D.** (2004) Hand washing and hand disinfection: more than your mother taught you. *Anesthesiol Clin North America*, **22**(3): p. 457-71
253. **Akyol, A., H. Ulusoy and I. Ozen** (2006) Handwashing: a simple, economical and effective method for preventing nosocomial infections in intensive care units *J Hosp Infect*, 2006. **62**(4): p. 395-405.
254. **Nicolau, D.V., Jr., G. Kith and A. Oshmyansky** (2010) Evidence for a simple linear relationship between MRSA rates and hand-washing compliance *J Hosp Infect.* **75**(2): p. 140-1.
255. **Cummings, K.L., D.J. Anderson and K.S. Kaye** (2010) Hand hygiene noncompliance and the cost of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **31**(4): p. 357-64.
256. **Helms, B. et al.** (2010) Improving hand hygiene compliance: A multidisciplinary approach. *Am J Infect Control.* doi:10.1016/j.ajic.2009
257. **Erasmus, V. et al.** (2009) A qualitative exploration of reasons for poor hand hygiene among hospital workers: lack of positive role models and of convincing evidence that hand hygiene prevents cross-infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **30**(5): p. 415-9.
258. **Walther, B. and M. Grobbel** (2009) Nosokomiale Infektionen in der Kleintierpraxis. *Kleintierpraxis*, **54**(1): p. 33-42.

259. **Ruscher, C. et al.** (2010) Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. *Vet Microbiol.* doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.008
260. **Coenye, T. and P. Vandamme** (2003) Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes *FEMS Microbiol Lett*, **228**(1): p. 45-9.
261. **Walther, B. et al.** (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Vet. Microbiol.* **127**(1-2): p. 171-8.
262. **Strommenger, B. et al.** (2006) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *J Antimicrob Chemother*, **57**(3): p. 461-5.
263. **Cuny, C. et al.** (2006) Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans *Euro Surveill*, **11**(1): p. 44-7.
264. **Millar, B.C. et al.** (2007) Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *J Hosp Infect*, **67**(2): p. 109-13.
265. **Xu, B.L. et al.** (2009) Predominance of the Hungarian clone (ST 239-III) among hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered throughout mainland China. *J Hosp Infect*, **71**(3): p. 245-55.
266. **Conceicao, T. et al.** (2007) Replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study *Clin Microbiol Infect*, **13**(10): p. 971-9.
267. **Holden, M.T. et al.** (2010) Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic- and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, sequence type 239 (TW). *J Bacteriol*, **192**(3): p. 888-92.
268. **Garza-Gonzalez, E. et al.** (2010) Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol Infect*, **138**: p. 645-654
269. **Brown, D.F. et al.** (2005) Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *J Antimicrob Chemother*, **56**(6): p. 1000-18.
270. **Phillips, W.E., Jr. and B.J. Williams,** (1984) Antimicrobial susceptibility patterns of canine *Staphylococcus intermedius* isolates from veterinary clinical specimens. *Am J Vet Res*, **45**(11): p. 2376-9.
271. **Lloyd, D.H., A.I. Lampion and C. Feeney** (1996) Sensitivity to antibiotics among cutaneous and mucosal isolates of canine pathogenic staphylococci in the UK, 1980–1996. *Vet. Dermatol.* **7**: p. 171–175.

272. **Steen, S.I. and P.J. Webb** (2007) Meticillin resistance in veterinary staphylococcal isolates. *Vet Rec*, **160**(18): p. 635-6.
273. **Schissler, J.R. et al.** (2009) Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute interpretive criteria for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *J Vet Diagn Invest*, **21**(5): p. 684-8.
274. **Rantala, M. et al.** (2004) Survey of condition-based prescribing of antimicrobial drugs for dogs at a veterinary teaching hospital. *Vet Rec*, **155**(9): p. 259-62.
275. **Pedersen, K. et al.** (2007) Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. *J Antimicrob Chemother*, **60**(4): p. 775-81.
276. **Cox, H.U. et al.** (1984) Antimicrobial susceptibility of coagulase-positive staphylococci isolated from Louisiana dogs. *Am J Vet Res*, **45**(10): p. 2039-42.
277. **Pellerin, J.L. et al.** (1998) Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **21**(2): p. 115-33.
278. **Lloyd, D.H.** (2007) Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. *Clin Infect Dis*, **45 Suppl 2**: p. S148-52.
279. **Jones, R.D. et al.** (2007) Prevalence of oxacillin- and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001-2005). *J Am Vet Med Assoc*, **230**(2): p. 221-7.
280. **Futagawa-Saito, K., W. Ba-Thein and T. Fukuyasu** (2007) High occurrence of multi-antimicrobial resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from healthy and diseased dogs and domesticated pigeons. *Res. Vet. Sci.*, **83**(3): p. 336-9.
281. **Hesselbarth, J. et al.** (1995) Insertion elements in *Staphylococcus intermedius* *Lett Appl Microbiol*, **20**(3): p. 180-3.
282. **Ihrke, P.** (1998) Bacterial Infections of the skin. In: Greene, CE (ed): Infectious diseases of the dog and cat. WB Saunders, Philadelphia, PA, 1998: p. 541-554.
283. **Pellerin, J.L. et al.** (1998) Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **21**(2): p. 115-33.
284. **Luthje, P. and S. Schwarz** (2007) Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. *Int J Antimicrob Agents* **29**(5): p. 528-35.
285. **Boerlin, P. et al.** (2001) Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin *Vet Microbiol*, **79**(2): p. 155-69.

286. **Mason, I. and M. Kietzmann** (1999) Cephalosporins-pharmacological basis of clinical use in veterinary dermatology. *Vet Dermatol*, **10**(3): p. 187-192.
287. **Guardabassi, L., S. Schwarz and D.H. Lloyd** (2004) Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother*, **54**(2): p. 321-32.
288. **Noble, W.C. and J. Naidoo** (1978) Evolution of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: the role of the skin. *Br J Dermatol*, **98**(4): p. 481-9.
289. **Kwochka, K.W. and J.J. Kowalski** (1991) Prophylactic efficacy of four antibacterial shampoos against *Staphylococcus intermedius* in dogs *Am J Vet Res*, **52**(1): p. 115-8.
290. **Ascher, F. et al.** (1990) Controlled trial of ethyl lactate and benzoyl peroxide shampoos in the management of canine surface pyoderma and superficial pyoderma. In: von Tschärner C, Halliwell REW, eds. *Advances in Veterinary Dermatology*, London: Ballière Tindal, p. 375-82.
291. **Linek, M.** (2010) Topische Therapien in der Dermatologie –macht das Sinn? *Tierärztl Prax*, **38**(Suppl 1): p. 50-56.
292. **Yasuda, T. et al.** (1993) Comparison of bactericidal activities of various disinfectants against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Postgrad Med J*, 69 Suppl 3:S66-9.
293. **Russell, A.D.** (2003) Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis*, **3**(12): p. 794-803.
294. **Guardabassi, L., G. Ghibaud and P. Damborg** (2009) In vitro antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA *Vet Dermatol*, **21**(3): p. 282-86

## 10 Weitere Publikationen im Rahmen der Promotion

Walther B, Monecke S, Ruscher C, Friedrich AW, Ehricht R, Slickers P, Soba A, Wleklinski C, Wieler LH, Lübke-Becker A

**Comparative molecular analysis substantiates a zoonotic potential of equine Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

Journal of Clinical Microbiology; 2009. 47(3): p. 704-10.

Vincze S, Paasch A, Walther B, Ruscher C, Lübke-Becker A, Wieler LH, Kohn B

**Multidrug- and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as a cause of canine pyoderma: A case report**

**Fallbericht: Methicillin- und multiresistente *Staphylococcus pseudintermedius* als Ursache einer caninen Pyodermie**

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 2010, *In Press*

### VORTRÄGE

Ruscher C, Lübke-Becker A, Paasch A, Wleklinski C, Soba A, Wieler L H, Walther B

**„Methicillin-resistente *Staphylococcus pseudintermedius*: klinische Bedeutung, Prävalenz und Diagnostik“**

17. Jahrestagung der Fachgruppe Innere Medizin und klinische Labordiagnostik der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)

Berlin, 31.01.2009

Ausgezeichnet mit dem Schattauer - Preis 2009

Ruscher C, Lübke-Becker A, Wleklinski C, Soba A, Wieler LH, Walther B

**“Prävalenz methicillinresistenter *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) in diagnostischem Probenmaterial 2007“**

Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)

Braunschweig, 26.6.2008

### POSTER

Ruscher C, Lübke-Becker A, Wleklinski C, Soba A, Wieler LH, Walther B

**Microbiological diagnosis of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from clinical samples of small animals and equidae**

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Dresden, 21.-24.9.08

Abstract in: International Journal of Medical Microbiology (IJMM; 298S2, 2008, Suppl. 45, MSP16)

Ruscher C

**Molekulare Epidemiologie der Methicillin-Resistenz animaler Staphylokokken**

2. Doktoranden-Symposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, 8.6.2007

Walther B, Ruscher C, Wieler L H, Lübke-Becker A

**Beyond MLST, PFGE, SCC<sub>mec</sub> and *spa*-typing: Comparative Analysis of 185 virulence and resistance-associated factors of MRSA isolates from equine and human origin**

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Dresden, 21.-24.9.08

Abstract in: International Journal of Medical Microbiology (IJMM; 298S2, 2008, Suppl. 45, MSP16)

Walther B, Ruscher C, Wleklinski CG, Soba A, Wieler L H, Lübke-Becker A  
**Comparative molecular typing of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reveals a limited clonal diversity**

Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)

Braunschweig, 25.6.-27.6.2008

Walther B, Ruscher C, Lübke-Becker A, Wieler L H

**Genetic characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from clinical specimens of various animal species investigated by molecular typing procedures**

59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM), Göttingen, 30.9. - 4.10.2007

Abstract in: Int. J. Med. Microbiol. 297 (S1), S. 144

## 11 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich all denjenigen danken, durch deren Unterstützung und Einsatz diese Arbeit überhaupt erst möglich wurde.

In erster Linie gilt mein Dank Prof. Wieler für die Überlassung dieses interessanten und spannenden Themas sowie für die kontinuierliche Unterstützung und Betreuung bei der Umsetzung. Die konstruktiven und fruchtbaren Diskussionen, nicht nur im Rahmen des wöchentlichen Seminars, haben einen wichtigen Beitrag zur Auseinandersetzung mit dem eigenen Thema aber auch zur Horizonterweiterung geleistet. Auch für die Möglichkeit der Weiterbildung auf Tagungen, Kongressen und Lehrgängen während meiner Promotionszeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Bei Dr. Antina Lübke-Becker und Dr. Birgit Walther möchte ich mich für die fachliche Betreuung der Arbeit bedanken.

Der NaFöG Promotionsförderung danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Ein großer Dank geht an alle Mitarbeiter des Diagnostikteams, ganz besonders an Andrea und Mirjam. Ich habe sehr viel von Euch lernen können und Ihr habt mir bei allen Fragen und Problemen immer freundlich und engagiert zur Seite gestanden. Besonders den Umgang mit heimtückischen und widerspenstigen Etikettiermaschinen habt Ihr mir immer wieder gerne erklärt.

Bei Dr. Claus-G. Wleklinski, Alexandra Šoba und dem restlichen Team von Synlab.vet Augsburg möchte ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit, das Übersenden von so vielen Stämmen, die Durchführung der MHK-Testung und die stets freundliche Beantwortung meiner unzähligen Fragen bedanken. Auch Dr. Ivonne Stamm vom Labor Vet med Lab in Ludwigsburg gilt mein besonderer Dank. Nicht nur für die bereitgestellten Stämme, sondern vor allem für die kompetente und konstruktive Kritik beim Überarbeiten der Publikationen und die große Hilfe beim Sammeln der Daten zu den einzelnen Stämmen und Patienten. Ihnen allen habe ich oft eine Menge zusätzliche Arbeit mit meinen Anfragen, Nachfragen und Wünschen bereitet, und Sie alle waren trotzdem immer freundlich, hilfsbereit und engagiert und damit eine sehr große Unterstützung für diese Arbeit.

Bei Dr. Esther-Maria Antáo bedanke ich mich sehr für das stets geduldige Korrigieren der englischen Publikationen. Torsten Semmler danke ich für die Hilfe beim Auswerten der Sequenzdaten und für das Erstellen der wunderschönen MS-Trees.

Bei dem Institutsengel Heike Görs möchte ich mich ganz besonders bedanken. Mit Deiner pragmatischen und unkomplizierten Art warst Du mir bei jedem kleinen und großen Problem eine so liebevolle und wichtige Hilfe. Du bist die Beste!

Ein besonders großes, dickes Dankeschön mit Küsschen geht an meinen Vater Norbert Ruscher und auch an meine Oma. Ihr habt mit Eurem unerschütterlichen Vertrauen in meine Fähigkeiten und der jahrelangen bzw. mittlerweile jahrzehntelangen Unterstützung, mein Studium und diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht. Ich bin Euch unendlich dankbar!

Mohammad, Dir gebührt mein größter Dank. Deine bedingungslose Unterstützung und Dein starker Rückhalt waren nicht nur für das Gelingen dieser Arbeit unverzichtbar. Du hast jeden einzelnen Vortrag gefühlte 1000mal geduldig angehört und bist dabei inzwischen selbst zum Staphylokokken-Experten geworden. Deine Tipps und Ratschläge und auch Deine Hilfe im Kampf gegen die Statistik waren für meine Entwicklung und meine Arbeit so wertvoll. Ganz nebenbei hast Du mir immer wieder gezeigt wie unglaublich schön das Leben ist.

Meinen Komplizinnen Katrin, Antje, Angela, Swaantje, Corinna und Alex möchte ich für die Freundschaft und den Zusammenhalt danken. Durch Euch hat sich jede Sorge mit Humor, einem Augenzwinkern und ein paar Häppchen Sushi umgehend in Luft aufgelöst. Was will man mehr...?

## **12 Selbständigkeitsversicherung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig, ohne unzulässige fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Claudia Ruscher

Berlin, 2010