

Abschlussbericht

für das Entscheidungshilfe-Projekt 2808HS029/2808HS040
aus dem Entscheidungshilfe-Verbundvorhaben
„MRSA-Problematik in der Nutztierhaltung“

Titel:

„Vorkommen von MRSA in der Stallluft und Abluft von Tierhaltungen“



Friese, A. und Rösler, U.

**Institut für Tier- und Umwelthygiene (ITU)
Freie Universität Berlin**

im Verbund mit

Schulz, J. und Hartung, J.

**Institut für Tierhygiene Tierschutz und Nutztierethologie (ITTN)
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover**

Berichts- und Projektzeitraum 01.07.2009 bis 31.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	3
1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens	4
1.2 Stand der Wissenschaft zum Projektstart	7
2. Material und Methoden	11
2.1 Auswahl der Bestände	11
2.2. Probenahmeplan im Bestand	11
2.3. Untersuchung der Proben	15
2.4. Statistische Analysen	17
3. Ergebnisse	18
3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	18
3.1.1 MRSA in Schweinebeständen	18
3.1.1.1 MRSA innerhalb von Schweinebeständen - Ergebnisse der Querschnittsstudie	19
3.1.1.2 MRSA in der Abluft und Umgebung von Schweinebeständen – Ergebnisse der Longitudinalstudie	24
3.1.2. MRSA in Geflügelmastbeständen	30
3.1.2.1 MRSA innerhalb von Geflügelbeständen - Ergebnisse der Querschnittsstudie	30
3.1.2.2 MRSA in der Abluft und Umgebung von Geflügelmastbeständen – Ergebnisse der Longitudinalstudie	34
3.1.3 MRSA in Kälbermastbeständen	39
3.2 Diskussion der Ergebnisse	40
3.2.1 MRSA innerhalb von Schweinebeständen	40
3.2.2 MRSA in der Abluft und Umgebung von Schweinemast- und –zuchtbeständen	42
3.2.2 MRSA innerhalb von Geflügelmastbeständen	44
3.2.3 MRSA in der Abluft und Umgebung von Geflügelmastbeständen	46
4. Zusammenfassung	48
5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen	50
6. Literaturverzeichnis	52

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Ziel dieses Teilprojektes war die Erfüllung eines Entscheidungshilfebedarfs des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) wissenschaftliche Untersuchungen zum Vorkommen von MRSA (Methicillin resistente *Staphylococcus aureus*) in der Stallluft und Abluft von Tierhaltungen durchzuführen. Dazu sollten Felduntersuchungen in konventionellen Stallsystemen von Schweine-, Geflügel- und Kälbermasthaltungen durchgeführt werden. Damit soll eine Abschätzung des Übertragungsrisikos luftgetragener MRSA-Stämme auf andere Tierbestände oder Anwohner in der Umgebung von Nutztierställen bzw. einen Eintrag von MRSA in die Umwelt ermöglicht werden. Die Ergebnisse des Vorhabens sollen in die Grundlagen der deutschen Rechtssetzung für die Überwachung von Tierbeständen hinsichtlich des Auftretens von MRSA eingehen und auf gemeinschaftlicher Ebene zur Ausgestaltung des Zoonosemonitoring gemäß Richtlinie 2003/99/EG dienen.

Dazu sollten

- die wichtigsten MRSA-Emissionsquellen anhand qualitativer Nachweise in MRSA-positiven Beständen ermittelt werden,
- der quantitative Nachweis von MRSA in der Stallluft erfolgen, um eine Ausbreitung der Keime im Stall einschätzen zu können,
- sowohl Sockentupfer als auch Luftproben in Luv und Lee entnommen und quantitativ auf MRSA analysiert werden, um die Emissionsfracht aus dem Stall heraus bei ausgewählten MRSA-positiven Beständen abschätzen zu können.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Für die im Arbeitsplan beschriebenen Hauptaufgabenbereiche ergab sich für das hier beantragte Forschungsvorhaben folgender Zeitplan (Meilensteinplanung) mit Angabe der jeweiligen Teilaufgaben (Tabelle 1):

Tabelle 1: Meilensteinplanung für Teilaufgaben im Projekt 2808HS029/HS040

Teilaufgabe	2009			2010				2011			
	Quartal			Quartal				Quartal			
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Projekt-/Verbundkoordination	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Methodenharmonisierung	■	■									
Materialbeschaffung, Vorbereitung der Messungen	■										
Bestandsauswahl (Schwein)	■	■									
Querschnittstudie (Schwein)		■	■	■	■	■	■				
Langzeitmessungen (Schwein)			■	■	■	■	■				
Vorlage der Zwischenergebnisse (Schwein)							■				
Bestandsauswahl (Kalb, Mastgeflügel)					■	■	■				
Querschnittstudie (Kalb, Mastgeflügel)						■	■	■	■		
Langzeitmessungen (Geflügel)						■	■	■	■	■	■
Berichtswesen/ Publikationen						■	■	■	■	■	■

Wie in Abb. 1 ersichtlich sah der Projektplan bezüglich der Schweinebestände die Durchführung der Querschnitts- sowie der Longitudinalstudien in insgesamt 23 Beständen vor. Dieses Ziel konnte im Projekt erreicht werden. Im Rahmen der Querschnittstudie wurden die ursprünglichen Vorgaben (n=23) mit der Untersuchung von 15 Schweinemastbeständen und 10 Schweinezuchtbestände über die Anforderungen hinaus erfüllt (n=25). Es wurden dabei 2 statt 3 reine Ferkelaufzuchtbestände untersucht, da diese besondere Betriebsform selten zu finden ist und es nicht möglich war, einen weiteren, kooperationswilligen MRSA-positiven Bestand zu finden.

Die avisierten Langzeituntersuchungen, welche pro Schweinebestand einmal im Quartal über ein Jahr hinweg erfolgten, wurden gemäß Projektplan in 6 Beständen (2 Zucht- und 4 Mastbestände) vollumfänglich durchgeführt.

Ein weiterer Fokus des Projektes lag auf der Untersuchung von Geflügelmastbeständen. Da sich hier die Bestandssuche und –auswahl infolge deutlich niedrigerer MRSA-Nachweise beim Screening gepaart mit einer deutlich geringeren Kooperations-Bereitschaft der wenigen MRSA-positiven Betriebe zur Teilnahme an der Studie als wesentlich schwieriger als beim Schwein herausstellte, wurde auf entsprechenden Antrag hin die Laufzeit für dieses Teilprojekt um drei Monate verlängert. Ursprünglich vorgesehen war die einmalige Untersuchung von 10 Beständen in der Querschnittstudie. Es wurden jedoch darüber hinaus gehend insgesamt 13 Geflügelbestände, davon 6 Broiler- und 7 Putenmastbestände, die beim initialen Screening als MRSA-positiv identifiziert werden konnten, einmalig analysiert. Insgesamt konnten hiervon jedoch nur 9 Bestände in die statistische Auswertung der Querschnittstudie einbezogen werden, da sowohl bei den beprobten Putenmastbetrieben als auch bei den Broilerbeständen jeweils zwei Bestände zum beprobten Zeitpunkt (das Screening erfolgte im vorherigen Mastdurchgang) komplett MRSA-negativ waren. Dies ist mit dem offensichtlich wechselnden MRSA-Status der Mastdurchgänge zwischen Screening und Beprobung zu erklären, was trotz aufwendigeren Voruntersuchungen zur Beprobung von Beständen mit negativen MRSA-Status innerhalb des Stalls führte. Diese Ergebnisse, wobei zum Teil auch die Stallumgebung dieser Bestände mit wechselndem MRSA-Status beprobt wurde, werden gesondert dargestellt. Von den ursprünglich 6 im Rahmen der Longitudinalstudie geplanten Beständen wurden 2 Broilermastbestände sowie 5 weitere Putenmastbestände mehrmalig einschließlich deren Umgebung untersucht. Der zeitliche Rahmen der Untersuchungen wurden nach Abstimmung mit dem Projektträger von ursprünglich einmal pro Quartal und somit viermal pro Jahr auf drei- bzw. viermal im Verlauf eines Mastdurchgangs im Broiler- bzw. Putenbestand geändert. Hintergrund dafür war der in den Voruntersuchungen festgestellte, wechselnde MRSA-Status der Bestände zwischen den einzelnen Durchgängen. Das erschwerte die gezielte Messung in einem aktuell MRSA-positiven Durchgang, da v.a. bei der Broilermast die Mastdauer mit ca. 35 – 40 Tagen sehr kurz ist. Zudem bliebe ohne dieses modifizierte Vorgehen die Frage nach der Herkunft bzw. der Einschleppung der Keime in einen Betrieb, der in einigen Durchgängen offensichtlich MRSA-negativ bleibt, unbeantwortet. Zur Bestandsauswahl (MRSA-Screening) wurden die Broilermastbestände dafür im letzten Viertel der vorherigen Mastperiode beprobt und bei einem MRSA-positiven Ergebnis wurde der anschließende Mastdurchgang innerhalb der Longitudinalstudie direkt nach Einstellung, nach ca. 14 Tagen und nach ca. 28 Tagen

untersucht. Zur Auswahl der Putenbestände wurde genauso vorgegangen, zusätzlich wurde hier der Bestand ca. 1-2 Wochen nach Einstallung erneut gescreent. Bei positivem Ergebnis wurde derselbe Bestand vier Mal bis zum Mastende (ca. 19 Wochen) umfangreich untersucht. Insgesamt wurden so 26 statt der ursprünglich im Rahmen der Longitudinaluntersuchungen geplanten 24 Bestandsuntersuchungen durchgeführt.

Die Ermittlung von 3 MRSA-positiven Kälbermastbeständen für die Querschnittsuntersuchung war jedoch trotz großen organisatorischen Aufwands nicht möglich. Reine Kälbermastbestände sind sehr selten und in keinem der von uns gescreenten Bestände (n=6) war ein Nachweis von MRSA möglich. Somit wurde nur ein Kälbermaststall, welcher zu einem landwirtschaftlichen Betrieb mit MRSA-positiven Schweinen gehörte, auf Verdacht mit dem kompletten Probenumfang untersucht.

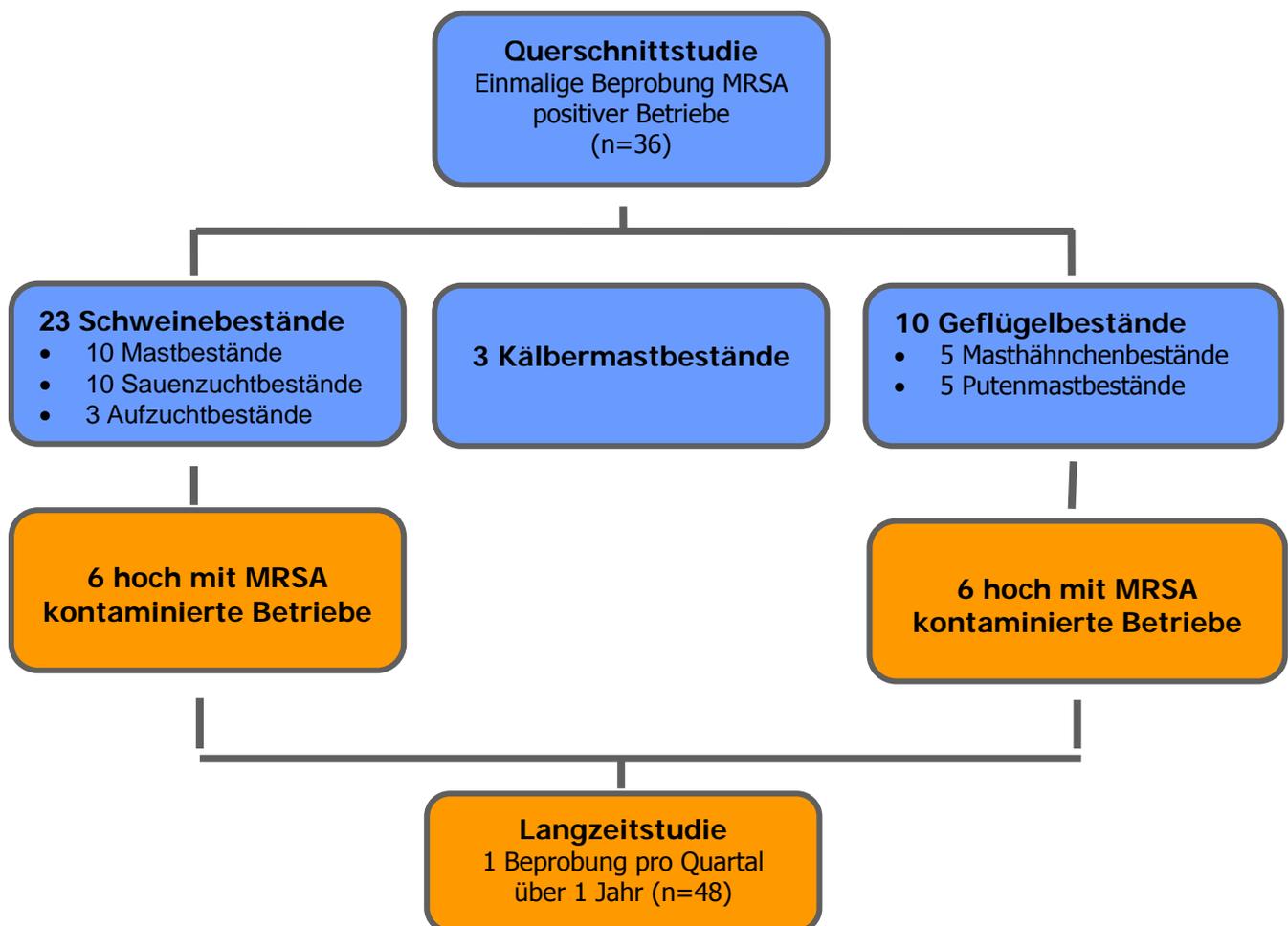


Abbildung 1: Anzahl der in Querschnittstudie und Langzeituntersuchungen zu beprobenden Betriebe.

1.2 Stand der Wissenschaft zum Projektstart

Staphylococcus aureus ist vielfach ein unauffälliger Besiedler von Haut, Nasen-, Mund- und Rachenraum von gesunden Menschen. Nur unter bestimmten Bedingungen wie nach Hautverletzungen oder Eintritt in Wunden kann es im Einzelfall zu Wundinfektionen, Abszessen oder auch zu Erkrankungen wie Pneumonie, Meningitis, Endocarditis oder Septikämie kommen (Kloos et al. 1992; Landolo 2000). Von solchen Infektionen ist in den letzten zwei Jahrzehnten weltweit besonders aus Krankenhäusern berichtet worden (Wenzel et al. 1991; Kipp et al. 2004). Die aus den betroffenen Patienten und ihrer unmittelbaren Umgebung isolierten *Staphylococcus aureus* Stämme wiesen i.d.R. eine hohe Resistenz gegenüber den meisten in Krankenhäusern eingesetzten Antibiotika, insbesondere gegenüber Beta-Lactam Antibiotika und Methicillin auf. Man bezeichnete daher die diese Erkrankungen auslösenden *Staphylococcus aureus* Stämme als **M**ethicillin resistente ***S**ta**ph**yl**o**co**cc**us **a**ureus (MRSA)* und, da sie ausschließlich in Krankenhäusern in Erscheinung traten, als „**h**ospital **a**cquired MRSA“ (haMRSA).

Seit einigen Jahren werden jedoch bei Teilen der Bevölkerung vermehrt Antibiotika resistente *Staphylococcus aureus* Stämme beobachtet, die nicht mit denen in den Hospitälern identisch sind und die auch nicht auf eine Übertragung oder Infektion aus diesem Bereich zurückzuführen sind (Kipp et al., 2004). Diese als ca (community acquired) –MRSA bezeichneten Stämme unterscheiden sich phäno- und genotypisch deutlich von den Isolaten aus dem Gesundheitswesen (Gonzalez et al. 2006; Klevens et al. 2006).

Daneben wird von so genannten „livestock associated“ (la)-MRSA Stämmen gesprochen. Dabei kommen sowohl Nutz- als auch Liebhabertiere als Reservoir in Frage (de Neeling et al. 2007; Lee 2006; Weese und Rousseau et al. 2005), wobei zwischen den MRSA, die bei Liebhaber- und Begleittieren auftreten, und denjenigen, die bei Lebensmittel liefernden Tieren gefunden werden, unterschieden wird. Ein spezifischer Klon dieser Stämme mit der Bezeichnung ST398, der den laMRSA zugeordnet wird, ist in den letzten Jahren vermehrt bei Nutztieren in einer Reihe von Ländern, so auch in Deutschland, nachgewiesen worden. Insbesondere in der Schweinehaltung hat sich dieser Keim verbreitet (Meemken et al. 2008), von wo er auch auf den Menschen übergehen und Infektionen hervorrufen kann (Witte et al. 2007; Wulf et al. 2007). Weiter werden auch die Liebhabertiere zunehmend als ein Reservoir für auf den Menschen übertragbare MRSA Stämme angesehen (Loeffler, A. et al., 2005). Träger sowohl von caMRSA als auch von haMRSA können dabei insbesondere Pferde, Hunde und Katzen sein und bei der Verbreitung scheinen die tierärztlichen Praxen eine Rolle zu spielen (e.g. Cuny et al. 2006). Klinische Erkrankungen beim Menschen durch MRSA werden nach Kontakt mit verschiedenen Tierarten berichtet. Schwere Erkrankungen

einschließlich Endokarditiden (Ekkelenkamp et al. 2006) und Pneumonien wurden nach Infektion mit dem IaMRSA Klon ST398 berichtet (Witte et al. 2007). In anderen Fällen führte der enge Kontakt mit einem infizierten Fohlen (Canadian epidemic MRSA-5, ST8) zu Hauterkrankungen bei drei Personen (Weese et al., 2006). Eine mit einem speziellen MRSA Stamm (PVL positiv (*lukS-PV* and *lukF-PV*) kontaminierte Hauskatze war der Auslöser für einen tiefen Abszess bei ihrer sonst gesunden Halterin (Sing et al. 2008).

Berichte über die Kontamination von Lebensmitteln tierischen Ursprungs, insbesondere von Fleisch (VWA 2007; Pu et al. 2008) und roher Kuhmilch (Moon et al. 2007) nehmen ebenfalls zu. Allerdings wird das Risiko für den Menschen über diesen Kontaminationsweg im Vergleich zum Kontakt mit Nutztieren als relativ gering eingeschätzt, zumal es bisher keine Belege für eine MRSA-Kolonisierung von Rachen oder Nasenbereich bei Menschen nach Fleischverzehr gibt.

Wie die Übertragung von MRSA und der verschiedenen klonalen Linien *in praxi* stattfindet und durch welche Faktoren diese beeinflusst wird, ist im Bereich der Nutztierhaltung noch weitgehend unklar (Meemken et al. 2008). Bekannt ist, dass MRSA von Tieren auf den Menschen übergehen können und Menschen mit direktem Kontakt zu Tieren wie Landwirte (Tierhalter), Halter von Haus- und Liebhabertieren, Tierärzte und Personal in Schlachtbetrieben einen höheren Kolonisierungsgrad als nicht auf diese Weise exponierte Personengruppen aufweisen (Khanna et al. 2008; Meemken et al. 2008; Wulf Sorum et al. 2008; Wulf Tiemersma et al. 2008). Die Übertragung findet vermutlich bei direktem Tierkontakt, durch indirekten Kontakt über kontaminierte Oberflächen oder Gegenstände, über belebte Vektoren wie z.B. Arthropoden oder über unbelebte Vektoren wie Luft, Wasser, Lebensmittel, Futter und besonders Staub (Förster et al. 2007; Shiomori et al. 2001) statt. Im Stallstaub von Schweineställen sind MRSA, einschließlich ST398, erst kürzlich nachgewiesen worden (Van den Broek et al. 2008). Dies bedeutet, dass die MRSA sich über den Luft getragenen Staub im ganzen Stallraum ausbreiten und über die Stallabluft in die Stallumgebung gelangen können, wie es auch von anderen Luft und Staub getragenen Stallkeimen bekannt ist (Seedorf und Hartung 2002). Die Ausbreitung über den Luftstaub kann einmal die Intraherdenprävalenz in einem Stall rasch erhöhen, stellt zum anderen ein Kontaminationsrisiko für Tierbestände in der Umgebung dar und kann darüber hinaus auch ein Kontaminationsrisiko für Anwohner mit möglichen Gesundheitsfolgen bedeuten.

Über die Luft-getragene Ausbreitung von MRSA aus der Nutztierhaltung in der Stallumgebung ist derzeit allerdings wenig bekannt. Rückschlüsse lassen sich allenfalls aus neueren Untersuchungen zur Emission und Ausbreitung von stallspezifischen Staphylokokken und *S. aureus* aus Broiler- und Mastschweineställen ziehen. Diese zeigen,

dass aus Broilerställen (Schulz, 2007; Seedorf et al. 2005) stammende Staphylokokken in der Hauptwindrichtung (leeseits) noch in einer Entfernung von annähernd 500 m nachgewiesen werden konnten, und im Außenbereich von Schweineställen fanden Gibbs et al. (2006) mit Hilfe von Kaskadenimpaktoren *S. aureus* Stämme in Entfernungen von 25 bis 150 m. vom Stall, die gegen eine Reihe von Antibiotika resistent waren (Methicillin Resistenz wurde dabei jedoch nicht getestet).

Bei letztgenannten Untersuchungen wurden Selektivmedien zum Nachweis der *S. aureus* Stämme benutzt. Dieses Verfahren ist für quantitative Untersuchungen in der Stallluft und der Stallabluft wegen der Gefahr der Überladung des Systems bei hohem Staubanfall (könnte nur durch sehr kurze Sammlerlaufzeiten kompensiert werden) und der möglichen Überfrachtung der Selektivmedien durch eine resistente Begleitflora weniger geeignet. Außerdem ist mit Impaktoren keine isokinetische Probenahme beispielsweise in oder direkt an Abluftschächten zur Bestimmung der Emissionen möglich.

Beim Einsatz von Probenahmeverfahren sind auch stets die Eigenschaften des gesuchten Mikroorganismus zu berücksichtigen. Von *S. aureus* ist bekannt, dass er relativ resistent gegenüber verschiedenen chemischen and physikalischen Einflüssen sein kann. Toleriert werden pH-Werte zwischen 4,5 und 9,0 und NaCl-Konzentrationen bis zu 9%. Die Hitzeresistenz hängt von den umgebenden Materialien und Strukturen ab. In 0,9 %iger NaCl Lösung wird *S. aureus* bei Temperaturen von 46°C inaktiviert. Sind jedoch schützende Stoffe wie Proteine z.B. aus Milch oder Eiter vorhanden, kann die Überlebenszeit bei 60°C 50 Minuten betragen. Unter trockenen Bedingungen kann *S. aureus*, wieder in Abhängigkeit von der Struktur und Beschaffenheit der Oberflächen und Materialien, an denen er anhaftet, mehrere Tage überleben (Beard-Pegler et al., 1988; Clements and Foster 1999; Rountree, 1963). Dennoch sollten die in der praktischen Hygiene benutzten üblichen physikalischen und chemischen Dekontaminationsmaßnahmen, wie sie gegen MSSA üblich sind, auch gegen MRSA einschließlich ST398 wirksam sein.

Hinsichtlich der Probenahme von MRSA aus Luft im Stallbereich und in der Stallumgebung aus Luft und von Oberflächen gibt es noch kein anerkanntes und validiertes Verfahren. Auch die von der EFSA angeregte Staubsammlung von Stalloberflächen erscheint wenig systematisch und vergleichbar zwischen verschiedenen Ställen. Vermutlich dürften sich für MRSA grundsätzlich die auch sonst für Staphylokokken üblicherweise benutzten Methoden und Verfahren eignen. Vergleichende systematische Untersuchungen liegen dazu aber nicht vor. So ist es denkbar, den Sedimentationsstaub im Stall auf beim Einsetzen zunächst sterilen definierten Oberflächen zu sammeln, womit ein Flächen- und Zeitbezug gegeben ist. Dieses definierte Vorgehen wurde in der Vergangenheit erfolgreich zur quantitativen Sammlung von Sedimentationsstaub sowohl in Schweineställen (Adrian und Hilliger 1988;

Hartung 1989) als auch in der Geflügelhaltung (Saleh 2006) angewandt. Mit der Sedimentationsmethode werden allerdings nur die tatsächlich sedimentierenden Keime erfasst. Außerdem kann kein Volumenbezug (KBE/m³) hergestellt werden. Dies ist mit Methoden wie der Filtration, der Impaktion und dem Impingement deutlich besser möglich, wobei sich die Befunde nur auf die zum Zeitpunkt der Messung in der Luft befindlichen Keime beziehen können. Für die gezielte Probenahme von Staphylokokken aus Stallluft eignen sich vorrangig das Impingement und die Filtration. Impaktoren neigen bei hoher Keimbelastung der Probenluft rasch zur Überladung, was meist eine Auswertung unmöglich macht. Die Filtration ist allerdings aufgrund der geringeren Ansauggeschwindigkeiten nicht direkt in Abluftschächten einsetzbar. Filter und Impingerflüssigkeiten lassen sich außerdem z.B. durch Kühlung oder Einfrieren längere Zeit für spätere mikrobiologische oder molekularbiologische Untersuchungen aufbewahren und archivieren. Beide Sammelverfahren können auch in der Außenluft eingesetzt werden, was für parallele Messeinstellungen von erheblichem Vorteil ist. Welches das effektivere Verfahren zum Nachweis von MRSA darstellt, kann derzeit noch nicht abgeschätzt werden, weshalb ein Methodenvergleich angebracht erscheint. Dieser sollte sich auch auf die Partikelabscheidecharakteristik, die maximalen Sammelzeiten und den Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der luftgetragenen MRSA beziehen. Ansätze beim Impinger, wie z. B. der Einsatz von schonenden Pufferzusätzen oder bei der Filtration durch gezielte Eluierung mit Anreicherungsmedien wurden bereits erarbeitet (Thorne et al. 1992; Schulz 2007). Eine Standardisierung der Luftprobenahmetechnik für MRSA würde künftig helfen, Befunde aus Feldmessungen besser miteinander vergleichen zu können. Dies schließt auch die Messungen zur Ausbreitung von MRSA über die Luft in der Stallumgebung ein. Mit standardisierten Methoden erhobene Messergebnisse werden die Abschätzung der atmosphärischen Ausbreitung von MRSA über Rechenmodelle sicherer machen können.

Insgesamt erfüllen laMRSA die Kriterien wie sie üblicherweise für klassische Zoonoseerreger gelten, allerdings breiten sich MRSA auch innerhalb einer Tierart und zwischen verschiedenen Tierarten aus und können vom Tier auf den Menschen übertragen werden (Juhasz-Kaszanyitzky et al. 2007). Wegen der vielfach unklaren Übertragungswege der laMRSA sowohl innerhalb der „Community“ und auch zwischen den klassischen Verbreitungsbereichen besteht ein dringender Klärungsbedarf zu Vorkommen und Verbreitung von laMRSA aus der Nutztierhaltung, besonders zum Genotyp ST398.

2. Material und Methoden

2.1 Auswahl der Bestände

Schweinebestände

Die zu beprobenden Bestände wurden zunächst anhand der Analyse von Staubproben aus 53 Betrieben ausgewählt. Einige Bestände, bei denen der Staub laMRSA-positiv getestet wurde, wurden unter Einbeziehung von Bestandsgröße, Betriebsform und –lage in die Studie aufgenommen.

Geflügelbestände

Zur Auswahl der Geflügelbestände wurden 71 Broilermast- und 85 Putenmastbetriebe kontaktiert. Dabei konnte von 40 Broilermast- und 85 Putenmastbetrieben der MRSA-Status bestimmt werden. Dieser wurde mit Hilfe der Untersuchung von Sockentupfern des Stalls und bei einigen Beständen zusätzlich durch Untersuchung von Staubproben sowie Haut- und Choanentupfern der Tiere (Bestandsbesuche durch ITU bzw. ITTN) erhoben.

Kälbermastbestände

Kälbermastbestände sollten auch durch die initiale Untersuchung von Staub- und Sockentupferproben ausgewählt werden.

2.2. Probenahmeplan im Bestand

In jedem untersuchten Bestand wurde ein umfangreicher, erster Fragebogen, welcher für alle Schweinebestände von der Außenstelle für Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover in Bakum und für die Geflügelmastbestände von den Teilprojektnehmern ITU und ITTN erstellt wurde, ausgefüllt. Bei wiederkehrenden Untersuchungen wurden die Daten entsprechend eines kürzeren Fragebogens erhoben.

Die Ergebnisse dieser Befragung wurden bzw. werden in die gemeinsame Datenbank des Verbundes eingepflegt, um für eine spätere Auswertung/Risikobewertung durch das BfR zur Verfügung zu stehen.

Querschnittstudie

In den Beständen, welche im Rahmen der Querschnittstudie untersucht wurden, wurden folgende Proben genommen:

Tierproben - Schwein

Von 60 Tieren eines Bestandes wurden jeweils Tupferproben des Nasenvorhofes sowie Tupferproben einer definierten Hautstelle (hinter einem Ohr) genommen.

Tierproben - Geflügel

Auch hier wurden von 60 Tieren des Bestandes Tupferproben der Haut (bei Broiler unter dem Flügel bzw. am Hals bei der Pute) sowie von den Choanen (Öffnungen des Rachenraums beim Vogel) entnommen.

Proben der Tierumgebung im Stall

Zur Ermittlung von möglichen Emissionsquellen für MRSA im Stall wurden verschiedene Proben innerhalb des Stalls untersucht.

Es wurden ca. 2,5g Staub als Sammelstaubprobe von mindestens fünf verschiedenen Stellen (außer Fensterbank) im Stall entnommen. Zudem wurden je eine Sammelprobe (ca. 250g) des Futters direkt aus den Trögen sowie des Kots aus dem Haltungsbereich sowie eine Sockentupferprobe vom Stallgang genommen. In den Geflügelställen wurde zusätzlich eine Sammelprobe der Einstreu erhoben.

Luftproben

An drei im Stall gleichmäßig verteilten Stellen wurden in einer Höhe von 1,50 m parallel Luftproben mittels Impingement und Filtration gesammelt.

Mit Hilfe des Impingers AGI-30 (All-Glas-Impinger) wurden die Proben über 30 Minuten mit einer Luftdurchflussrate von ca. 11-12 l/min gezogen. Bei der Methode der Filtration, unter Verwendung eines Polycarbonatfilters von 25 mm Durchmesser und 0,8 µm Porengröße, wurden die Luftproben über 150 Minuten mit einer Flussrate von 2,5 l/min entnommen.

Stallklima

Bei jeder Probenahme wurden an den jeweiligen Messstellen Lufttemperatur und –feuchte sowie Ammoniak- und Schwefelwasserstoffgehalt erfasst.

Longitudinalstudie

In den für die Longitudinalstudie ausgewählten Beständen wurden neben Proben im Stall auch welche außerhalb des Tierstalls genommen. Die ausgewählten Schweinebestände wurden einmal pro Quartal, also insgesamt viermal innerhalb eines Jahres, beprobt (Tabelle 2). Broilermastbestände wurden dreimal im Verlauf einer Mastperiode (ca. 35 – 40 Tage) und Putenbestände viermal während einer Mastperiode (ca. 19 Wochen) untersucht (Tabelle 3).

Proben innerhalb des Tierstalls

Die Probenahmen in den Beständen, welche im Rahmen der Longitudinalstudie untersucht wurden, erfolgte analog zu den in den Beständen der Querschnittstudie. Zusätzlich wurden im Stall aber noch Sedimentationsstaubproben genommen, indem im untersuchten Abteil Staub auf einem Blech (in 2 m Höhe) über einen Zeitraum von mehreren Wochen gesammelt wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sowie der Untersuchungen der Querschnitts- und Longitudinal-Studien fließen parallel auch in die Auswertung des TP „Optimierung des Probenahmeverfahrens“ des ITTN ein.

Proben außerhalb des Tierstalls

Neben den Proben innerhalb des Stalls wurden parallel weitere in der Umgebung des Stallgebäudes erhoben. Diese umfassten zeitgleich entnommenen Luftproben (100 m Luv, 50 + 150 m Lee; jeweils in 1,50 m Höhe) und, wenn zugänglich, Sockentupferproben (100 m Luv, 50 + 150 + 300 + 500 m Lee; jeweils 50 m des Untergrundes).

Die Luftproben wurden an drei Punkten außerhalb des Stalls parallel mit Hilfe des Impingers AGI-30 (90 min mit einer Luftdurchflussrate von 11-12 l/min) und des Polycarbonatfilters (150 min mit einer Luftdurchflussrate von 2,5 l/min) gesammelt.

Zusätzlich wurden in 2 m Höhe die wichtigsten Wetterdaten (Lufttemperatur, Luftfeuchte, Windgeschwindigkeit, Windrichtung) über den gesamten Zeitpunkt der Probenahme hinweg erfasst.

Tabelle 2: Bestandsinformation sowie Beprobungszeitpunkte der Schweinebestände der Longitudinalstudie.

Bestand	Produktionstyp	Tiere im Gebäude	1. Besuch JJ/MM/TT	2. Besuch JJ/MM/TT	3. Besuch JJ/MM/TT	4. Besuch JJ/MM/TT
1	Mastbestand	1 400	2009/09/14	2009/12/14	2010/03/14	2010/06/14
2	Zucht	500	2009/11/30	2010/03/02	2010/06/07	2010/09/06
3	Mastbestand	600	2010/03/29	2010/06/28	2010/11/02	2010/12/01
4	Zucht	500	2010/04/26	2010/07/05	2010/09/21	2010/12/07
5	Mastbestand	1 200	2010/03/02	2010/07/06	2010/09/21	2011/01/24
6	Mastbestand	1 600	2010/03/15	2010/06/01	2010/07/09	2011/01/17

Tabelle 3: Bestandsinformation sowie Beprobungszeitpunkte der Geflügelmastbestände der Longitudinalstudie

Bestand	Tierart	Tiere im Gebäude	1. Besuch JJ/MM/TT	2. Besuch JJ/MM/TT	3. Besuch JJ/MM/TT	4. Besuch JJ/MM/TT
1	Pute	5 500	2011/06/21	2011/07/05	2011/08/02	2011/08/16
2	Pute	5 250	2011/08/30	2011/09/14	2011/09/27	2011/10/24
3	Pute	4 200	2011/10/25	2011/11/07	2011/11/29	2011/12/12
4	Pute	4 500	2011/07/13	2011/09/20	2011/10/17	2011/11/7
5	Pute	6 000	2011/09/14	2011/09/26	2011/10/24	2011/11/14
6	Broiler	82 000	2011/07/12	2011/07/26	2011/08/09	-
7	Broiler	50 000	2011/10/19	2011/10/31	2011/11/14	-

2.3. Untersuchung der Proben

Alle Proben wurden gemäß des in Abbildung 2 dargestellten Kultivierungsschemas auf das Vorkommen von MRSA hin (qualitativ) untersucht, bei einigen erfolgte zusätzlich eine Quantifizierung der Keime.

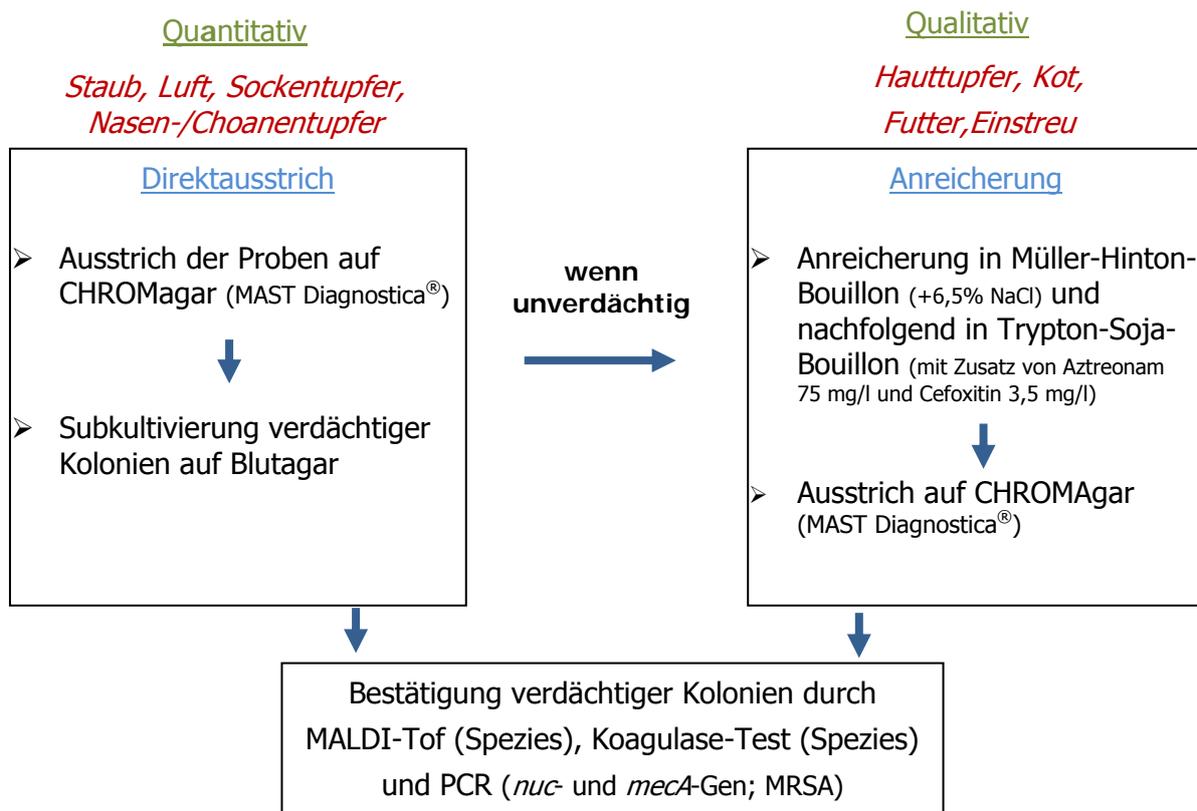


Abbildung 2: Kultivierungsschema und Bestätigung von MRSA aus den verschiedenen Proben

Nasentupfer der Schweine bzw. Choanentupfer der Broiler und Puten

Die Nasen- und Choanentupfer wurden quantitativ und qualitativ untersucht.

Von den 60 Tupfern wurden 12 Pools mit je fünf Tupfern sowie parallel 12 einzelne Tupfer analysiert.

In den einzelnen Nasen- bzw. Choanentupfern wurde, wenn möglich, eine Quantifizierung der Keime durchgeführt. Es erfolgte die Berechnung der Keimzahl als KbE (koloniebildende Einheiten) pro Tupfer.

Parallel wurden die nicht quantifizierbaren Einzeltiertupfer sowie die Tupferpools im Anreicherungsverfahren qualitativ untersucht.

Hauttupfer der Schweine, Broiler und Puten

Die Hauttupfer wurden qualitativ untersucht.

Analog zu den Nasen- bzw. Choanentupfern wurden von den insgesamt 60 Proben 12 Pools mit je fünf Tupfern und 12 einzelne Tupfer untersucht.

Die einzelnen Hauttupfer werden direkt auf den Selektiv-Agar ausgestrichen. Parallel wurden die Einzeltiertupfer sowie die Tupferpools im Anreicherungsverfahren untersucht.

Sammelstaubprobe

Bei der Sammelstaubprobe erfolgte die quantitative Bestimmung der Keimzahl pro Gramm Staub sowie eine Anreicherung der Probe bei negativem Ergebnis.

Sedimentationsstaubprobe

Die Sedimentationsstaubproben der Verbundpartner wurden quantitativ und qualitativ im Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Ostwestfalen-Lippe (Proben der Schweinebestände) oder in eigenen Laboratorien analysiert.

Sammelkotprobe, Sammelfutterprobe

Diese Proben wurden nach Anreicherung qualitativ auf das Vorkommen von MRSA untersucht.

Sockentupfer

Die Sockentupferproben der Verbundpartner wurden quantitativ und qualitativ im Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Ostwestfalen-Lippe (Schweinebestände) oder in eigenen Laboratorien analysiert.

Luftproben

Sowohl die Proben des Impingers als auch die des Filters wurden quantifiziert und die Keimzahl als KbE / m³ Luft angegeben. Es wurde die Konzentration von MRSA und vergleichend auch die Konzentration von *Staphylococcus spp.* sowie die Gesamtkeimzahl bestimmt.

Spa-Typisierung ausgewählter MRSA-Isolate

Von 22 Schweineständen der Querschnittstudie wurde der *Spa* -Typ jeweils eines Isolats eines Nasentupfers und eines der dazugehörigen Luftprobe gemäß der Methode von Harmsen et al., 2003 bestimmt. Im Rahmen der Longitudinalstudie der Schweinestände wurden die *Spa*-Typen von Isolatene verschiedener Proben, welche alle zu dem gleichen Zeitpunkt genommen wurden, bestimmt. Dafür wurden je ein Isolat eines Nasentupfers, einer Stallluftprobe und alle MRSA-positiven Proben der Stallgebäudeumgebung (Luft und/oder Sockentupfer) ausgewählt.

Auch aus verschiedenen Proben von Tieren, Tierumgebung sowie Stallumgebung der Geflügelmastbestände wurden entsprechende Isolate ausgewählt und *spa*-typisiert.

2.4. Statistische Analysen

Die statistischen Auswertungen wurden mit den Programmen SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) sowie SAS software version 9.1.3 (SAS institute Inc. Carry, NC, USA) durchgeführt. Dabei dienten zum Vergleich von bakteriellen Konzentrationen die geometrischen Mittelwerte der positiven Proben.

Zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden zwischen den Prävalenzen der Proben aus den verschiedenen Produktionstypen wurde der χ^2 -Test genutzt, wobei bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ Unterschiede als signifikant gewertet wurden. Beim Vergleich der unterschiedlichen Prävalenzen zwischen Proben der Puten- bzw. Broilerbestände wurde bei niedriger Probenzahl z.T. der exakte Fisher-Test (2-seitige Signifikanz) angewandt.

Um die MRSA-Nachweisraten der verschiedenen Probenarten miteinander zu vergleichen, wurde der McNemar-Test verwendet.

Korrelationen von MRSA-Nachweisraten verschiedener Proben wurde mit Hilfe der Spearman-Korrelation (Spearman's rho) berechnet. Der Zusammenhang zwischen der Konzentration von MRSA in der Luft und der Anzahl von positiven Luftproben im Stall wurde mittels des Kendall's tau (τ) ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 MRSA in Schweinebeständen

Auswahl der Schweinebestände

Die Auswahl der Schweinebestände erfolgte anhand laMRSA-positiver Staubproben, welche von den Betrieben zugesandt wurden. Die umfangreicheren Untersuchungen in den ausgewählten Betrieben erfolgten maximal drei Monate nach dieser Vorselektion.

Insgesamt wurden Sammelstaubproben von 53 Beständen, 26 Mast- und 27 Zuchtbestände, untersucht (Abbildung 3). In 58,5 % der Staubproben konnte MRSA nachgewiesen werden.

Von den untersuchten Mastbeständen wurden bei 76,9 % MRSA in den Staubproben gefunden, bei den Zuchtbeständen waren es 40,7 %.

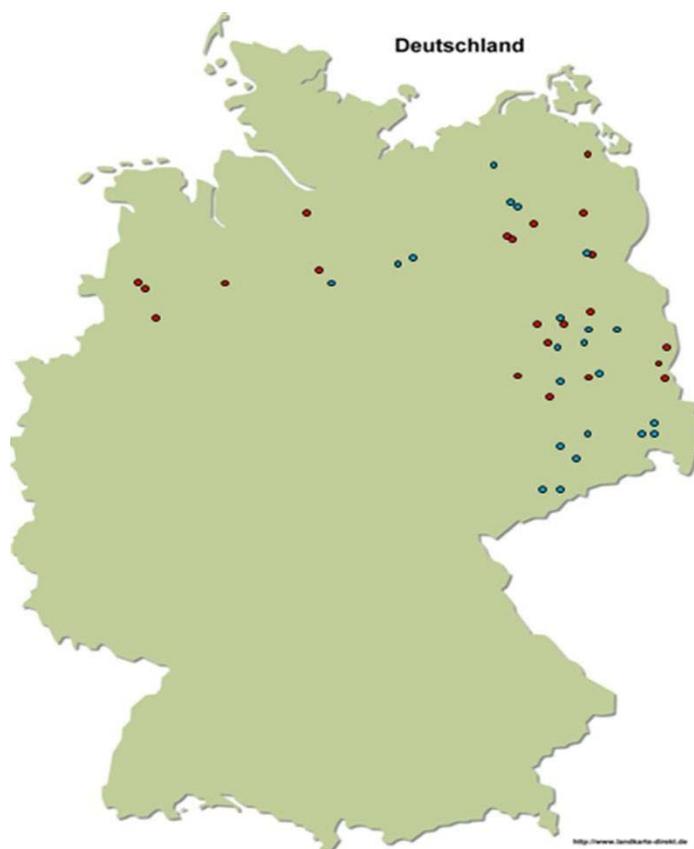


Abbildung 3: Lage der untersuchten Schweinemast- und Schweinezuchtbetriebe. Blau = MRSA-negativ; Rot = MRSA-positiv.

Ausschließlich ausgewählte Bestände, welche in dieser Voruntersuchung MRSA-positive Staubproben aufwiesen, wurden in die Studie aufgenommen.

3.1.1.1 MRSA innerhalb von Schweinebeständen - Ergebnisse der Querschnittsstudie

Im Rahmen der Querschnittsstudie wurden insgesamt 27 Betriebe ausgewählt. Davon waren 15 Schweinemastbestände, in welchen zwischen 700 und 12000 Tieren (Median: 3025) gehalten wurden, 10 Zuchtbestände mit 90 bis 1600 Zuchtsauen (Median: 450) und zwei Ferkelaufzuchtbetriebe mit 960 bzw. 2700 Ferkeln.

Alle Untersuchungen wurden in einem repräsentativen Stall des jeweiligen Betriebes durchgeführt. Dabei wurden der Abferkelbereich in den Zuchtbetrieben und ein Stall mit Tieren von mindestens 90 Tagen Lebensalter in den Mastbetrieben ausgewählt. Alle Bestände wurden gemäß identischem Probenahmeprotokoll untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und zusätzlich graphisch in Abbildung 4 zusammengefasst.

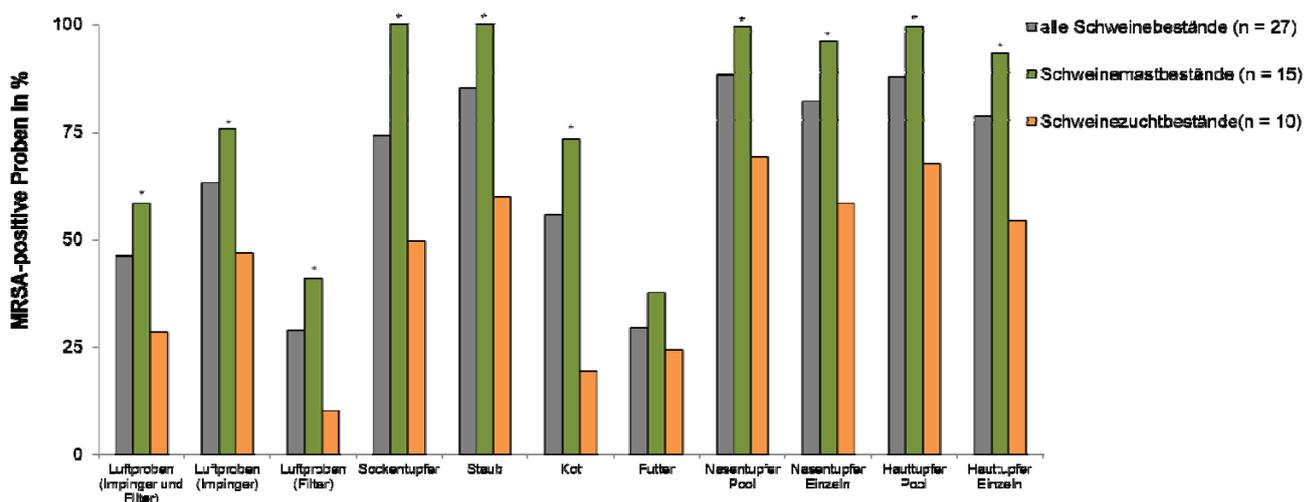


Abbildung 4: Graphische Darstellung der Ergebnisse aller untersuchten Proben. Das Sternchen kennzeichnet signifikante Unterschiede in den Nachweishäufigkeiten von laMRSA in den verschiedenen Proben zwischen Schweinemast- und -zuchtbeständen.

Tabelle 4: Nachweis von laMRSA in Luft-, Umgebungs- und Tierproben (innerhalb des Stalls) von allen untersuchten Schweinebeständen

	Alle Bestände (n = 27)*	Mastbestände (n = 15)	Zuchtbestände (n = 10)
<i>MRSA-positive Bestände in % ermittelt mit Hilfe von:</i>			
Impingement	85,2	100	60
Filtration	55,6	80,0	20
alle Luftproben	85,2	100	60
<i>MRSA-positive Proben in % der Umgebung innerhalb des Stalls:</i>			
Impingement	63	75,6	46,7
Filtration	28,8	40,9	10,0
Alle Luftproben	46,0	58,4	28,3
Sockentupfer	74,1	100	49,6
Staub	85,2	100	59,7
Kot	55,6	73,3	19,3
Futter	29,4	37,5	24,2
<i>MRSA-positive Tierproben in %:</i>			
Gepoolte Nasentupfer	88,3	99,4	69,2
Einzelnasentupfer	82,1	96,1	58,3
Gepoolte Hauttupfer	87,7	99,4	67,5
Einzelhauttupfer	78,7	93,3	54,2

Anzahl der entnommenen Luftproben in allen Beständen/Mastbeständen/Zuchtbeständen ist n = 161/89/60 für alle Luftproben (Impinger und Filter), n = 81/45/30 für Impingerproben, n = 80/44/30 für Filterproben, n = 27/15/10 für Sockentupfer, n = 27/15/10 für Staub, n = 27/15/10 für Kot, n = 17/ 8/8 für Futterproben und n = 324/180/120 für Tiertupferproben. *ergibt sich aus 15 Mast-, 10 Zucht- und 2 Ferkelaufzuchtbeständen

MRSA in der Stallluft

In 85,2 % aller untersuchten Bestände (23/27) konnte mit Hilfe des Impingements laMRSA in der Luft gefunden werden (d.h. mindestens eine von drei Luftproben war MRSA-positiv). Die Nachweisraten mittels Filtration waren mit 55,6 % positiver Bestände dagegen signifikant niedriger ($p = 0,008$). Betrachtet man die verschiedenen Produktionstypen konnten in 100 % der Schweinemastbestände und in 60 % der Zuchtbestände laMRSA in der Luft gefunden werden. Signifikant mehr einzelne Luftproben aus den untersuchten Mastbeständen waren MRSA-positiv im Vergleich zu den Zuchtbeständen ($p = 0,008$ für Impingement, $p = 0,003$ für Filtration). Bei zwei Mastbeständen war nur eine Luftprobe MRSA-positiv, bei drei

Beständen waren alle sechs Proben positiv. Im Gegensatz dazu gab es keinen Zuchtbestand, in dem alle sechs Luftproben positiv für MRSA getestet wurden, aber vier Bestände mit vollständig negativen Luftproben.

MRSA wurde insgesamt häufiger in den Impingerproben (51/81) als in den Filterproben (23/80) gefunden ($p < 0,001$). Die Konzentrationen von MRSA in den Luftproben sind in Abbildung 5 dargestellt. Der geometrische Mittelwert für MRSA in den positiven Proben betrug $257 \text{ KbE} / \text{m}^3$ für Impingement und $802 \text{ KbE} / \text{m}^3$ für Filtration, wobei die Konzentrationen der beiden Verfahren miteinander korrelierten (Spearman's rho = 0,65) (Abbildung 6). Zusätzlich konnte eine positive Beziehung zwischen der Anzahl an MRSA-positiven Luftproben in einem Stall und der MRSA-Konzentration in allen Luftproben ($\tau = 0,768$), in den Impingerproben ($\tau = 0,661$) und in den Filterproben ($\tau = 0,868$) festgestellt werden.

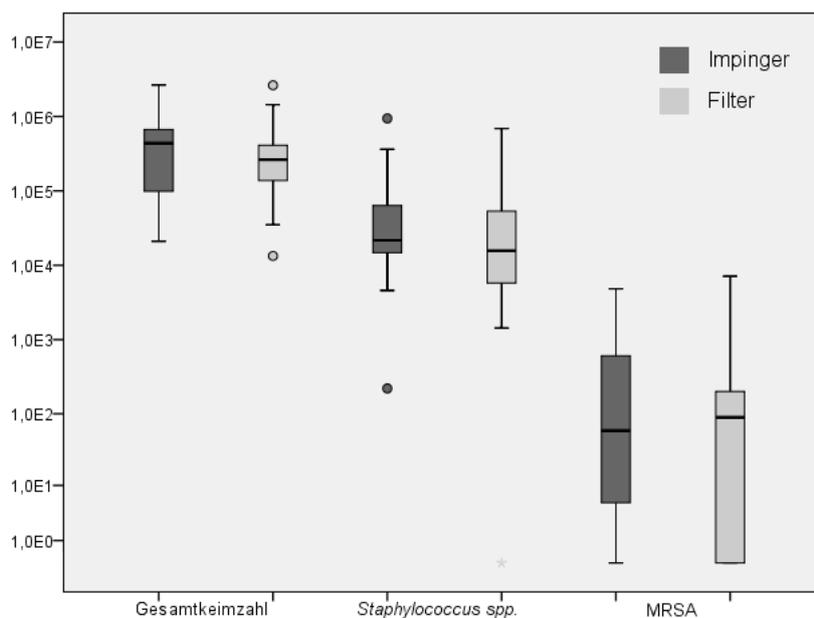


Abbildung 5: Gesamtkeimzahl, Anzahl von *Staphylococcus spp.* und MRSA in Luftproben aus 27 Schweineställen mittels Impingement bzw. Filtration. Die Boxen repräsentieren das obere Quartil, den Median sowie das untere Quartil der Werte. Die oberen und unteren Whisker zeigen Werte, die innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstand (= Länge der Box) liegen. Punkte stellen Ausreißer dar. Die Anzahl der ausgewerteten Proben beträgt für Impingement/Filtration $n = 75/75$ bezüglich der Gesamtkeimzahl, $n = 69/69$ für *Staphylococcus spp.* und $n = 81/80$ für MRSA.

Die geometrischen Mittelwerte der Gesamtkeimzahl in den Luftproben lagen für das Impingement bei $3,1 \times 10^5$ KbE / m³ und bei $2,4 \times 10^5$ KbE / m³ für Filtration, bezüglich der *Staphylococcus spp.*-Konzentration bei $1,4 \times 10^4$ KbE / m³ und $2,6 \times 10^4$ KbE / m³. Der Anteil von MRSA an der Staphylokokken-Fraktion betrug somit 1,8 % für das Impingement und 3,1 % bezüglich der Filtration (Abbildung 5), der Anteil an der Gesamtkeimzahl 0,08 % bzw. 0,33 %.

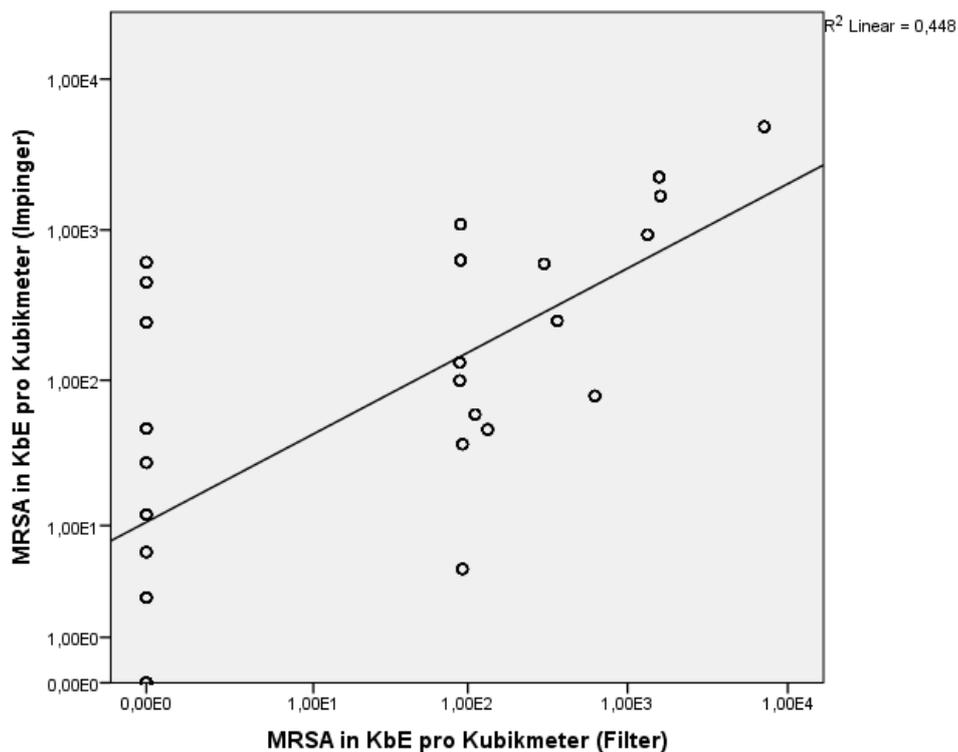


Abbildung 6: Korrelation der MRSA-Konzentrationen in Luftproben des Impingers und des Filters. Spearman's rho = 0,65.

MRSA in der Tierumgebung im Stall

MRSA konnte regelmäßig in den Proben der Tierumgebung im Stall nachgewiesen werden (Tabelle 4). Im Staub konnten die Keime mit 85,2 % Nachweishäufigkeit am häufigsten gefunden werden. Der geometrische Mittelwert aller quantitativ auswertbaren Stallstaubproben lag für MRSA bei $3,9 \times 10^4$ KbE / g mit einem Minimum von 10^3 KbE / g und einem Maximum von $2,3 \times 10^6$ KbE / g. Im Vergleich zu den anderen Umgebungsproben war die Nachweisrate im Staub signifikant höher als in den mittels Filtration entnommenen Luftproben ($p = 0,008$), den Kot- ($p = 0,008$) oder Futterproben ($p = 0,002$). Beim Vergleich

zu den Impingerluft- und Sockentupferproben hingegen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 1,0$ bzw. $p = 0,25$).

Immer wenn MRSA im Staub gefunden werden konnte, war auch ein Nachweis in mindestens einer von drei Impingerproben möglich. Die Korrelation der MRSA-Konzentration in Staub- und Impingerproben war allerdings nur schwach (Spearman's rho = 0,31).

In den beprobten Schweinemastbeständen waren mit Ausnahme der Futterproben ($p = 0,59$) die Nachweisraten der anderen Umgebungsproben signifikant höher als in den Proben der Zuchtbestände ($p = 0,008$ für Staub, $p = 0,002$ für Sockentupfer und $p = 0,009$ für Kotproben, siehe Tabelle 4 und Abbildung 4).

MRSA bei den Mast- und Zuchtschweinen (Tierproben)

In allen untersuchten Schweinebeständen wurde laMRSA in den Tiertupferproben nachgewiesen. Dabei waren in einem Zuchtbestand alle Nasentupferproben MRSA-negativ, in einem anderen alle Hauttupfer. In 88,3 % der untersuchten Nasentupferpools ($n = 324$) und in 87,7 % der Hauttupferpools wurde MRSA nachgewiesen (Tabelle 4). Die Prävalenzen waren dabei signifikant höher in den gepoolten Proben (McNemar test, $p < 0.01$) als in den Einzeltupfern von Nase (82,1 %) oder Haut (78,7 %). Bei den quantitativ auswertbaren Nasentupferproben wurde ein mittlerer Keimgehalt von $3,4 \times 10^2$ / Tupfer (Minimum: 15 KbE / Tupfer, Maximum: $4,8 \times 10^3$ KbE / Tupfer) ermittelt.

Eine schwache Korrelation zwischen der Anzahl an MRSA-positiven Luftproben im Stall zum prozentualen Anteil an positiven gepoolten bzw. einzeln analysierten Nasentupfern (Spearman's rho = 0,42 bzw. 0,39) sowie zu den gepoolten bzw. einzeln analysierten Hauttupfern (Spearman's rho = 0,44 bzw. 0,46) konnte festgestellt werden. Bezüglich der Keimkonzentrationen korrelierte der MRSA-Gehalt in Nasentupfern und Impinger- oder Filterluftproben nicht positiv (Spearman's rho = 0,11 and 0,21), wohingegen die MRSA-Konzentration im Staub und Nasentupfern schwach korrelierte (Spearman's rho = 0,45).

Die MRSA-Prävalenz der Tierproben war in den Proben der Mastbestände signifikant höher als in denen der Zuchtbestände ($p < 0.01$).

Spa-Typisierung ausgewählter Isolate

Die sowohl bei Isolaten der Nasentupfer als auch der Luftproben ermittelten vorherrschenden *Spa*-Typen waren t011 und t034. Je zweimal wurde der *Spa*-Typ t108 in beiden Probenarten nachgewiesen. Andere *Spa*-Typen, t1451 und t1255, wurden nur in Nasentupfern detektiert (Tabelle 5).

Die *Spa*-Typen t011 sowie t034 werden dem Sequenztyp ST398 zugeordnet, welcher als livestock-associated MRSA (laMRSA) gilt.

Tabelle 5: *Spa* –Typisierung von ausgewählten MRSA-Isolaten aus Nasentupfern und Luftproben von 22 Schweinebeständen

		Luftprobe		
		<i>Spa</i> -Typ	t 011	t 034
Nasentupfer	t 011	9	1	-
	t 034	1	6	1
	t 108	1	-	1
	t 1255	-	1	-
	t 1451	-	1	-

3.1.1.2 MRSA in der Abluft und Umgebung von Schweinebeständen – Ergebnisse der Longitudinalstudie

Die im Rahmen der Longitudinal-Untersuchungen erlangten Ergebnisse aller Außenluftproben sowie der Proben der Bodenoberfläche in der Abluftfahne der beprobten Stallgebäude sind für alle sechs Schweinebestände der Longitudinalstudie für die vier Probenahmezeitpunkte in Tabelle 6 aufgeführt. Der zeitgleich erfolgte Nachweis von MRSA innerhalb des Tierstalls ist exemplarisch anhand der Ergebnisse des Sockentupfers vom Stallgang, der Stallluftprobe sowie der Nasentupfer der Schweine dargestellt.

Innerhalb des Stalls war stets ein laMRSA-Nachweis in den Proben des Stallgangs sowie bei den Tieren möglich. Bis auf drei Ausnahmen im Winter und Herbst waren auch alle Stallluftproben MRSA-positiv.

Bei der Untersuchung der Außenluftproben waren laMRSA bei drei verschiedenen Beständen und in insgesamt fünf Luftproben nachweisbar. Die laMRSA-Konzentration in diesen Außenluftproben war mit 2 KbE / m³ (zweimal bei Lee 150m) und 14 KbE / m³ (zweimal bei

Lee 50m) bzw. 11 KbE / m³ (einmal bei Lee 50m) sehr niedrig. In Luftproben der windzugewandten Luv-Seite des Stalls wurde zu keinem Zeitpunkt MRSA nachgewiesen.

Hingegen konnten bei 73 % der auf der windabgewandten Lee-Seite (bis zu 300m Abstand) genommenen Sockentupferproben deponierte laMRSA nachgewiesen werden, auf der Luv-Seite hingegen war dies mit 33 % in signifikant weniger Proben der Fall. Die erst im späten Projektverlauf in Rücksprache mit dem BMELV initiierten Untersuchungen von Sockentupferproben in 500m Lee-seitiger Entfernung konnten auf Grund der Gegebenheiten nicht regelmäßig entnommen werden. In einer dieser Proben jedoch konnte ebenfalls MRSA nachgewiesen werden.

Zudem wurde offenbar, dass im Sommer signifikant häufiger laMRSA in der Stallumgebung nachgewiesen werden konnte als im Frühling, Herbst oder Winter. Die statistische Auswertung des Vergleichs der verschiedenen Proben der Stallgebäudeumgebung untereinander sind in Tabelle 7 dargestellt, der Einfluss der Jahreszeiten in Tabelle 8. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind hierbei grau unterlegt.

Tabelle 6: laMRSA-Detektion im Stall und in der Stallgebäudeumgebung der sechs Schweinebestände der Longitudinalstudie

Bestand	Windabgewandte Seite des Stalls (Lee)					Proben innerhalb des Stalls			Windzugewandte Seite des Stalls (Luv)	
	Boden 300m	Boden 150m	Boden 50m	Luft 150m	Luft 50m	Stallgang F S H W	Stallluft F S H W	Schweine F S H W	Luft 100m	Boden 100m
	F S H W	F S H W	F S H W	F S H W	F S H W				F S H W	F S H W
1	- + + +	- + + -	- - + +	- - - -	- - - -	+ + + +	+ + + -	+ + + +	- - - -	- - 0 -
2	- + + -	- + - -	- + + +	- - - -	- + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	- - - -	- + - 0
3	+ + - +	+ + - +	+ + - +	- - - -	- - - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	- - - -	- + - +
4	- - + -	+ + + +	+ + + -	- - - -	0 - - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	- - - -	- + - -
5	0 + 0 +	+ + + +	0 + + +	- + + -	- + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	0 - - -	0 + - +
6	+ + + +	+ + + +	0 0 + +	- - - -	+ - - -	+ + + +	+ + - -	+ + + +	- - 0 -	0 0 0 -

F = Frühling; S = Sommer; H = Herbst, W = Winter; + = laMRSA-positive Proben; - = laMRSA-negative Proben; o = Probenahme nicht möglich

Tabelle 7: Unterschiede zwischen der Anzahl von laMRSA-positiven Proben von verschiedenen Sammelpunkten (McNemar-Test).

Proben- anzahl (n)	Probe 1	positive Proben in 1	% positive Proben 1	Probe 2	positive Proben in 2	% positive Proben 2	<i>P</i>
17	Boden 300m Lee	11	65	Boden 100m Luv	6	35	0,059
18	Boden 150m Lee	13	72	Boden 100m Luv	5	28	0,008
18	Boden 50m Lee	13	72	Boden 100m Luv	5	28	0,008
20	Boden 50m Lee	15	75	Boden 300m Lee	13	65	0,32
22	Boden 150m Lee	16	73	Boden 300m Lee	15	68	0,65
16	Boden 150m Lee	11	69	Boden 50m Lee	11	69	1,0

Tabelle 8: Einfluss der Jahreszeiten auf die Nachweishäufigkeit von laMRSA in den Proben der Stallumgebung

verglichene Proben (n)	Jahreszeit 1	positive Proben in 1	% positive Proben in 1	Jahreszeit 2	positive Proben in 2	% positive Proben in 2	<i>p</i>
35	Sommer	19	54	Frühling	9	26	0,004
34	Herbst	12	35	Frühling	9	27	0,37
34	Winter	9	27	Frühling	12	35	0,26
37	Herbst	15	35	Sommer	21	57	0,021
39	Winter	14	36	Sommer	21	54	0,02
37	Herbst	14	38	Winter	14	38	1,0

Spa-Typisierung

Insgesamt 41 Isolate wurden mittels *Spa*-Typing untersucht (Tabelle 9). In der Umgebung aller Bestände war auch der jeweils bei den Tieren isolierte *Spa*-Typ zu finden. Dabei konnte bei den Isolaten der Proben aus dem Stall sowie außerhalb des Stallgebäudes bei drei Beständen ausschließlich der *Spa*-Typ t011 gefunden werden. Bei Bestand 4 wurde bei Isolaten der Sockentupfer vom Boden auf der windabgewandten Lee-Seite zusätzlich noch der *Spa*-Typ t034 ermittelt. Die Isolate des Bestands 5 wurden vorwiegend dem *Spa*-Typ t108 zugeordnet, wobei auch hier noch ein weiterer Typ (t1344) aus der Sockentupferprobe der windabgewandten Seite gefunden wurde. Im Bestand 6 wurden drei verschiedene *Spa*-Typen bei allen MRSA-Isolaten erhoben, t034, t1451 und t011.

Die drei untersuchten Außenluftproben wiesen alle den identischen *Spa*-Typ wie die dazugehörige Stallluftprobe auf.

Tabelle 9: *Spa* –Typisierung von ausgewählten laMRSA-Isolaten aus Stall sowie Stallgebäudeumgebung der sechs Schweinebestände der Longitudinalstudie

Bestand	Datum	Probenart	<i>Spa</i>-Typ
1	2009/09/14	Nasentupfer	t011
		Stallluft	t011
		Sockentupfer Stall	t011
		Sockentupfer 50m Lee	t011
		Sockentupfer 150m Lee	t011
		Sockentupfer 300m Lee	t011
		2	2010/06/07
Stallluft	t011		
Luft 50m Lee	t011		
Sockentupfer Stall	t011		
Sockentupfer 50m Lee	t011		
Sockentupfer 150m Lee	t011		
Sockentupfer 300m Lee	t011		
		Sockentupfer 100m Luv	t011

Bestand	Datum	Probenart	Spa-Typ
3	2010/01/12	Nasentupfer	t011
		Stallluft	t011
		Sockentupfer Stall	t011
		Sockentupfer 50m Lee	t011
		Sockentupfer 150m Lee	t011
		Sockentupfer 300m Lee	t011
		Sockentupfer 100m Luv	t011
4	2010/09/21	Nasentupfer	t011
		Stallluft	t011
		Sockentupfer Stall	t011
		Sockentupfer 50m Lee	t034
		Sockentupfer 150m Lee	t034
		Sockentupfer 300m Lee	t011
5	2010/07/06	Nasentupfer	t108
		Stallluft	t108
		Luft 50m Lee	t108
		Sockentupfer Stall	t108
		Sockentupfer 50m Lee	t108
		Sockentupfer 150m Lee	t1344
		Sockentupfer 300m Lee	t108
		Sockentupfer 100m Luv	t108
6	2010/03/15	Nasentupfer	t1451
		Stallluft	t034
		Luft 50m Lee	t034
		Sockentupfer Stall	t1451
		Sockentupfer 150m Lee	t011
		Sockentupfer 300m Lee	t1451

3.1.2. MRSA in Geflügelmastbeständen

Auswahl der Geflügelbestände

Bei 22 der 85 gescreenten Putenmastbetriebe konnte laMRSA gefunden werden; das entspricht 25,9 %. Bei den Putenmastbetrieben war es möglich, vor Aufnahme des Bestandes in die Querschnitt- bzw. Langzeitstudie ein nochmaliges Screening speziell des zu beprobenden Mastdurchganges (kurz nach Einstallen) durchzuführen, um so einen positiven MRSA-Status sicherzustellen.

Bezüglich der Broilermastbetriebe wurden 40 verschiedene Betriebe im Rahmen des Screenings untersucht, wobei in neun (22,5 %) MRSA nachgewiesen wurde. Bei wiederholter Beprobung des gleichen Betriebes, jedoch des folgenden Mastdurchganges, konnte der Keim dann oftmals nicht erneut gefunden werden. Dies hatte zur Folge, dass Betriebe mit vormals MRSA-positivem Status beprobt wurden und dann jedoch alle Proben innerhalb des Stalls negativ waren. Diese Bestände wurden bei der folgenden Ergebnisdarstellung der Querschnitt- bzw. Longitudinalstudien nicht mit einbezogen, sondern gesondert aufgeführt.

3.1.2.1 MRSA innerhalb von Geflügelbeständen - Ergebnisse der Querschnittstudie

Für die Querschnittstudie konnten insgesamt 9 Betriebe mit zum Beprobungszeitpunkt positivem MRSA-Status untersucht werden. Die Betriebsgröße der fünf Putenmastanlagen variierte zwischen 10.000 und 36.000 Puten (Median von 23.000), die der vier Broilermastbetriebe zwischen 35.000 und 352.000 Tieren mit einem Median von 250.000. Die Anzahl der Tiere in dem jeweiligen beprobten Stall des Betriebes betrug für die Putenställe im Mittel 5.250 (von 4.500 bis 6.000), für die Broilerhallen 34.000 (von 8.000 bis 82.000). Es handelte sich ausschließlich um konventionelle Betriebe, wobei die Stallart im Falle der putenhaltenden Betriebe ein Offenstallsystem mit Querlüftung war, die Broilermastställe hingegen wurden ausnahmslos zwangsbelüftet.

Für die Untersuchungen wurde ein repräsentativer Stall des Betriebes ausgewählt, wobei sich die Tiere stets mindestens im letzten Drittel der Mastperiode befanden. Alle Bestände wurden mit dem gleichen Probenahmeprotokoll untersucht. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Nachweis von MRSA in Luft-, Tierumgebungs- und Tierproben von allen untersuchten Geflügelbeständen

	Alle Bestände (n = 9)	Putenbestände (n = 5)	Broilerbestände (n = 4)
<i>MRSA-positive Bestände in % ermittelt mit Hilfe von:</i>			
Impingement	77,8	80	75
Filtration	77,8	80	75
alle Luftproben	77,8	80	75
<i>MRSA-positive Proben in % der Umgebung innerhalb des Stalls:</i>			
Impingement	59,3	60	58,3
Filtration	70,4	60	75
Sockentupfer	55,6	60	50
Staub	66,7	60	75
Kot	22,2	20	25
Futter	66,7	80	50
Einstreu*	20	33,3	0
<i>MRSA-positive Tierproben in %:</i>			
Gepoolte Choanentupfer	63,9	71,7	54,2
Einzelchoanentupfer	56,5	61,7	50
Gepoolte Hauttupfer	66,7	80	50
Einzelhauttupfer	64,8	76,7	50

Anzahl der entnommenen Luftproben in allen Beständen/Putenmastbeständen/Broilermastbeständen ist n = 54/30/24 für alle Luftproben (Impinger und Filter), n = 27/15/12 für Impingerproben, n = 27/15/12 für Filterproben, n = 9/5/4 für Sockentupfer, n = 9/5/4 für Staub, n = 9/5/4 für Kot, n = 9/5/4 für Futter, n = 5/3/2 für Einstreu* und n = 108/60/48 für Tiertupferproben.

MRSA in der Stallluft

In sieben von neun (77,8 %) untersuchten Geflügelbeständen konnte laMRSA in der Stallluft nachgewiesen werden, d.h. mindestens eine von sechs Luftproben war MRSA-positiv. Die gleiche Nachweisrate wurde bei unabhängiger Betrachtung der beiden Verfahren, Impingement und Filtration, ermittelt. Beim Vergleich der Tierarten (Pute vs. Masthähnchen) wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des MRSA-Nachweises in der Luft, unabhängig der Methode, gefunden (Fisher-test mit $p = 1,0$).

Sowohl bei den Putenbeständen als auch bei den Broilern gab es einen Bestand mit positivem MRSA-Status, in welchem die gesuchten Keime nicht in der Luft nachgewiesen werden konnten.

Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an MRSA-positiven Tierproben und der Anzahl positiver Luftproben im Stall (Spearman 's rho: 0,75 bis 0,8).

Obwohl es die Prävalenzen vermuten lassen, wurden keine signifikanten Unterschiede in der Nachweishäufigkeit von MRSA zwischen den beiden Sammelmethoden gefunden (McNemar-Test, $p=0,13$). Die mittleren MRSA-Konzentrationen (geometrisches Mittel) in der Stallluft, berechnet aus allen positiven Proben, betragen beim Impingement $882 \text{ KbE} / \text{m}^3$ und bei der Filtration $574 \text{ KbE} / \text{m}^3$ Luft. Die Konzentration der Staphylokokken lag bei $1,3 \times 10^6 \text{ KbE} / \text{m}^3$ bzw. $7,6 \times 10^5 \text{ KbE} / \text{m}^3$ und die der Luft-Gesamtkeime bei $2,1 \times 10^6 \text{ KbE} / \text{m}^3$ bzw. $1,2 \times 10^6 \text{ KbE} / \text{m}^3$ für Impingement und Filtration. Der Anteil an MRSA an der Staphylokokkenfraktion in der Stallluft betrug somit 0,07 % bzw. 0,08 %, der an der Gesamtkeimzahl 0,04 % bzw. 0,05 % für Impingement bzw. Filtration.

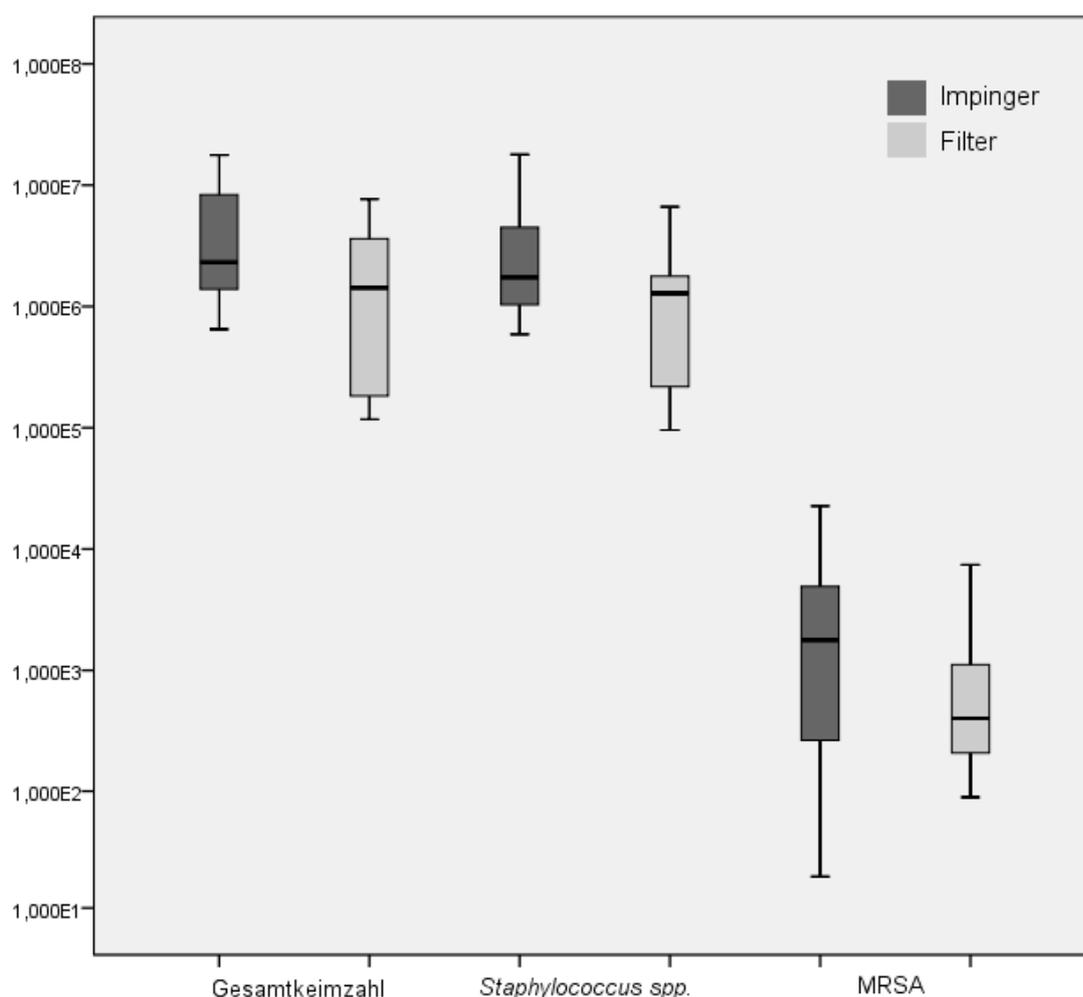


Abbildung 7: Gesamtkeimzahl, Anzahl von *Staphylococcus spp.* und MRSA in Luftproben aus 9 Geflügelställen mittels Impingement bzw. Filtration. Die Boxen repräsentieren das obere Quartil, den Median sowie das untere Quartil der Werte. Die oberen und unteren Whisker zeigen Werte, die innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstand (= Länge der Box) liegen. Punkte stellen Ausreißer dar. Die Anzahl der ausgewerteten Proben beträgt für Impingement/Filtration $n = 27/26$ bezüglich der Gesamtkeimzahl, $n = 27/25$ für *Staphylococcus spp.* und $n = 16/18$ für MRSA.

MRSA in der Tierumgebung im Stall

In den Proben der Tierumgebung innerhalb des Stalls konnte laMRSA regelmäßig nachgewiesen werden (Tabelle 10), wobei der MRSA-Nachweis neben Staubproben in der Luft am häufigsten gelang. Der geometrische Mittelwert der insgesamt fünf quantitativ auswertbaren Staubproben der Querschnittstudie lag bei $1,9 \times 10^4$ KbE / g mit einem Minimum von 133 KbE / g und einem Maximum von $4,8 \times 10^5$ KbE / g. Beim Vergleich der MRSA-Nachweishäufigkeiten in den verschiedenen Probenmatrices konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden, genauso wie beim Vergleich der beiden Tierarten (Pute vs. Masthähnchen).

MRSA bei Masthähnchen und Puten (Tierproben)

In den meisten der neun untersuchten Geflügelbestände konnte laMRSA in den Tiertupferproben nachgewiesen werden. In einem Broilermastbetrieb war jedoch sowohl in den Choanen- also auch in den Hauttupferproben keine Detektion der resistenten Keime möglich, in einem zweiten Broilerbetrieb wurde MRSA nur in den Choanentupferproben gefunden. In allen anderen Beständen waren stets beide Tupferarten MRSA-positiv.

In 63,9 % der untersuchten Choanentupferpools ($n = 108$) und in 66,7 % der Hauttupferpools wurde MRSA nachgewiesen, wobei in den Pools der Choanentupfern signifikant häufiger MRSA gefunden wurde als in den Einzeltupfern mit 56,5 % ($p = 0,039$). Dieser Unterschied konnte bezüglich der einzelnen Hauttupfer (64,8 %) nicht festgestellt werden. Bei den nur 20 quantitativ auswertbaren Choanentupferproben wurde ein mittlerer Keimgehalt von 35 KbE / Tupfer (Minimum: 15 KbE / Tupfer, Maximum: 338 KbE / Tupfer) ermittelt.

Beim Vergleich der beiden Tierarten fiel ein signifikanter Unterschied bei den Detektionsraten in den Hauttupferproben, sowohl Pool- als auch Einzelproben, auf ($p = 0,001$ bzw. $p = 0,004$). Dabei war der MRSA-Nachweis in den Putenhaltungen höher.

3.1.2.2 MRSA in der Abluft und Umgebung von Geflügelmastbeständen – Ergebnisse der Longitudinalstudie

Insgesamt wurden fünf Putenmast- und zwei Broilermastbetriebe über den Zeitraum kurz nach Einstellung bis kurz vor Ausstallung untersucht.

Die Ergebnisse aller Außenluftproben sowie der Proben der Bodenoberfläche um das beprobte Stallgebäude herum sind für alle Bestände und für die vier bzw. drei Probenahmezeitpunkte im Mastverlauf in Tabelle 11 aufgeführt. Der zeitgleiche Nachweis von MRSA innerhalb des Tierstalls ist exemplarisch anhand der Ergebnisse der Sammelstaubprobe, der Stallluftprobe sowie der Choanentupfer der Tiere dargestellt.

Bis auf Bestand 3, einem Putenbestand, welcher kurz nur nach Einstellung der Tiere MRSA-positiv gescreent war (Screening-Ergebnis aber nicht Bestandteil der Longitudinalstudie), war stets ein Nachweis von laMRSA innerhalb der Ställe im Verlauf der Longitudinalstudie möglich. In allen anderen Beständen wurden laMRSA zu jedem Probenahmezeitpunkt im Staub, der Luft oder in den Tierproben gefunden.

In der Außenluft der windabgewandten Seite konnte in insgesamt fünf Proben von zwei Betrieben laMRSA, jeweils an den beiden letzten Probenahmezeitpunkten, nachgewiesen werden. Die Keimkonzentrationen lagen am Messpunkt 50m-Lee-Seite bei 33 KbE / m³, 7 KbE / m³ bzw. 93 KbE / m³; am Messpunkt 150m-Lee-Seite bei 11 KbE / m³ bzw. 23 KbE / m³.

In Luftproben der windzugewandten Luv-Seite des Stalls wurde zu keinem Zeitpunkt MRSA nachgewiesen.

Auf der windabgewandten Lee-Seite, der Abluftfahne, wurde in 50m Entfernung in 52 % (13/25) der Sockentupferproben Proben laMRSA gefunden, in 150m Entfernung in 50 % (13/26), bei 300m in 33,3 % (8/24) und in 500m Entfernung in 33,3 % (2/6; in beiden der beprobten zwei Broilermastbetriebe). Sockentupferproben in 500m Entfernung konnten auf Grund der örtlichen Gegebenheiten jedoch nicht regelmäßig entnommen werden. In den Sockentupferproben der Bodenoberfläche auf der windzugewandten Luv-Seite konnte in 26,9 % (7/26) der Proben und damit signifikant seltener als Lee-seitig MRSA gefunden werden. Eine Quantifizierung der Sockentupferproben der Bodenoberflächen war nur in fünf Fällen möglich und die Keimgehalte waren mit 1 bis maximal 118 KbE / Tupfer eher gering.

Die statistische Auswertung des Vergleichs der verschiedenen Proben der Stallgebäudeumgebung untereinander sind in Tabelle 12 dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) sind grau unterlegt.

Tabelle 11: laMRSA-Detektion im Stall und in der Stallgebäudeumgebung der sieben Geflügelbestände der Longitudinalstudie

Bestand	Windabgewandte Seite des Stalls (Lee)						Proben innerhalb des Stalls			Windzugewandte Seite des Stalls (Luv)	
	Boden 500m	Boden 300m	Boden 150m	Boden 50m	Luft 150m	Luft 50m	Staub 1 2 3 4	Stallluft 1 2 3 4	Tiere 1 2 3 4	Luft 100m	Boden 100m
	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4				1 2 3 4	1 2 3 4
1 P	0000	----	+---	+---	----	----	-+--	+---	+---+	----	----
2 P	0000	-+--	-+++	-+++	----	----	+++-	++++	++++	----	-+--
3 P	---+	----	--+-	----	----	----	----	----	----	----	----
4 P	0000	+--+	+--+	0+++	00-+	00+-	+--+	--++	++++	00--	+--+
5 P	0000	0-++	--++	-+++	0-++	0-++	--++	-+++	+--+	0---	---+
6 B	000	-+-	-+-	-+-	000	---	-++	-++	-++	---	---
7 B	0+-	++0	+++	+++	0--	0--	-++	--+	---	0--	+--

P = Pute, B = Broiler; 1 = erste Probenahme; 2 = zweite Probenahme; 3 = dritte Probenahme; 4 = vierte Probenahme
 + = laMRSA-positive Proben; - = laMRSA-negative Proben; o = Probenahme nicht möglich

Tabelle 12: Unterschiede zwischen der Anzahl von laMRSA-positiven Proben von verschiedenen Sammelpunkten um die Geflügelställe (McNemar-Test).

Proben- anzahl (n)	Probe 1	positive Proben in 1	% positive Proben 1	Probe 2	positive Proben in 2	% positive Proben 2	P
24	Boden 300m Lee	8	33	Boden 100m Luv	7	29	1,0
26	Boden 150m Lee	13	50	Boden 100m Luv	7	27	0,031
25	Boden 50mLee	13	52	Boden 100mLuv	6	24	0,016
23	Boden 50mLee	12	52	Boden 300mLee	7	30	0,063
24	Boden 150m Lee	12	50	Boden 300m Lee	8	33	0,125
25	Boden 150m Lee	12	48	Boden 50m Lee	13	52	1,0

Bei den beiden untersuchten Broilerbeständen 6 und 7 fiel auf, dass beim ersten Beprobungszeitpunkt kurz nach Einstallung der Tiere jeweils kein MRSA-Nachweis innerhalb des Stalls möglich war. Im Verlauf der Mast wurden Proben der Tierumgebung, wie Staub oder Luft, in beiden Ställen dann MRSA-positiv, wobei die Tiere des Bestand 7 bis Mastende MRSA-negativ blieben, die des Bestands 6 jedoch ab der 2. Beprobung MRSA-positiv getestet wurden. Bei Broiler-Bestand 7 (oder besser „Stall“ 7), in welchem die Tiere MRSA-negativ blieben, wurden zu einem späteren Zeitpunkt bei Abklärungs-Untersuchungen auch Tiere der Nachbarställe desselben Betriebes beprobt und hier konnte auch auf den Tieren selbst der Keim gefunden werden, was neben der MRSA-positiven Tierumgebung als Erklärung des positiven MRSA-Status der Stallumgebung bei negativem MRSA-Status im Stall dienen könnte. Auch im Putenbestand (Stall) 3 konnten in den später bei Abklärungs-Untersuchungen beprobten Nachbarställen desselben Betriebes MRSA bei den Tieren und in der Tierumgebung isoliert werden, während der Stall/„Bestand“ 3 selbst über den gesamten Untersuchungszeitraum in den Tier- und Tierumgebungsproben MRSA-negativ getestet wurde.

Geflügelbestände mit wechselndem MRSA-Status

Wie vorstehend beschrieben konnten einige Geflügelbestände weder in die Querschnitt- noch in die Longitudinalstudie aufgenommen werden, da sich, trotz intensiver Untersuchung vorheriger Mastdurchgänge, welche laMRSA-positiv waren, der umfangreich beprobte Folgedurchgang dann als MRSA-negativ herausstellte.

Dabei handelte es sich um je einen Puten- und einen Broilermastbestand, bei welchen alle Proben der Tiere und auch der Tierumgebung im Stall MRSA-negativ waren.

Bei einem weiteren Broilermastbetrieb wurden zwei aufeinander folgende Durchgänge beprobt, sowohl innerhalb als auch außerhalb des Stalls. Hierbei waren in beiden Durchgängen alle Proben der Tiere und der unmittelbaren Tierumgebung im Stall stets MRSA-negativ, in den Sockentupferproben der Stallgebäudeumgebung jedoch konnte zum ersten Beprobungszeitpunkt MRSA in allen vier Proben (100m Luv, 50m Lee, 150m Lee und 300m Lee), zum zweiten in zwei von vier (50m Lee und 150m Lee) Proben gefunden werden. Auch dieser Bestand wurde vormals als MRSA-positiv gescreent. Hinsichtlich der Lage dieses Bestandes ist zu erwähnen, dass im Umkreis von 1km Radius jedoch weitere Geflügelbetriebe lagen.

Spa-Typisierung

Insgesamt wurden 25 Isolate wurden mittels *Spa*-Typing untersucht (Tabelle 13). Dabei fällt auf, dass ähnlich wie bei den untersuchten Schweinebeständen die gleichen *Spa*-Typen sowohl in den Proben der Tiere bzw. der Tierumgebung im Stall als auch in den Sockentupfern der Bodenoberfläche außerhalb des Stalls gefunden wurden.

MRSA der *Spa*-Typen t011, t034, t899 und t1430 wurden erst kürzlich aus Geflügelfleisch (Pute und Broiler) isoliert (Fessler et al., 2011), wobei die Typen t011, t034 und t899 dem Sequenztyp 398 und somit den livestock-associated MRSA zugeordnet wurden. Der *Spa*-Typ t1430 wurde auch schon vorher in Geflügelfleisch gefunden und gehörte dem Sequenztyp 9 an (Abschlussbericht BfR, „Molekularbiologische Charakterisierung und Quantifizierung von Methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) aus landwirtschaftlichen Nutztieren und vom Tier stammenden Lebensmitteln“). Der *Spa*-Typ t108, bisher vorrangig bei Isolaten aus Proben von Schweinen gewonnen, wurde in verschiedenen Studien auch dem ST398 zugeordnet (de Neeling et al., 2007).

Tabelle 13: *Spa* –Typisierung von ausgewählten MRSA-Isolaten aus Stall sowie Stallgebäudeumgebung von vier Geflügelbeständen der Longitudinalstudie

Bestand	Datum	Probenart	<i>Spa</i>-Typ
1	2011/06/21	Choanentupfer 1	t011
		Choanentupfer 2	t011
		Hauttupfer 1	t011
		Hauttupfer 2	t011
		Sockentupfer 50m Lee	t011
		Sockentupfer 150m Lee	t011
2	2011/08/30	Choanentupfer	t034
		Hauttupfer	t034
		Staub	t011
		Sockentupfer 50m Lee	t034
		Sockentupfer 150m Lee	t034
		Sockentupfer 100m Luv	t034
6	2011/07/26	Choanentupfer 1	t1430
		Choanentupfer 2	t899
		Hauttupfer 1	t1430
		Hauttupfer 2	t899
		Staub	t1430
		Stallluft	t899
		Sockentupfer 50m Lee	t899
		Sockentupfer 150m Lee	t899
		Sockentupfer 300m Lee	t899
7	2011/10/19	Sockentupfer 100m Luv	t108
		Sockentupfer 50m Lee	t108
		Sockentupfer 150m Lee	t108
		Sockentupfer 300m Lee	t108

3.1.3 MRSA in Kälbermastbeständen

Aus den vorstehend genannten Gründen wurde nur ein Kälbermaststall, welcher zu einem landwirtschaftlichen Betrieb mit MRSA-positiven Schweinen (mit Personal, welches gelegentlich beide Tierställe betreute) gehörte, auf Verdacht hin mit dem kompletten Probenumfang untersucht. Dabei konnte jedoch in keiner Tierprobe (60 Nasen- und Analfaltentupfer) und auch in keiner Umgebungsprobe des Stalls (Staub, Kot, Sockentupfer, Umgebungstupfer, Luft) MRSA nachgewiesen werden.

3.2 Diskussion der Ergebnisse

3.2.1 MRSA innerhalb von Schweinebeständen

MRSA in der Stallluft und in der Tierumgebung

Es konnte in allen untersuchten Schweinebeständen zu jedem Untersuchungszeitpunkt laMRSA nachgewiesen werden. Dies war anzunehmen, da nur Betriebe mit positivem MRSA-Nachweis aus vorab zugesandten Staubproben in die Studie einbezogen wurden.

In 24 von 27 Beständen konnte laMRSA in der Stallluft gefunden werden. Bei den drei Beständen ohne MRSA-Nachweis aus den Luftproben handelte es sich jeweils um Schweinezuchtbestände, bei welchen auch in allen anderen Probe-Arten (Tierumgebung und Tiere) weniger häufig MRSA gefunden wurde. Insgesamt wiesen Schweinemastbestände signifikant höhere MRSA-Kontaminationsraten in der Stallluft der Tierumgebung auf als Schweinezuchtbestände (siehe auch Teilprojekt „Optimierung des Probenahmeverfahrens“). Ursächlich hierfür könnten die deutlich höheren Tierzahlen, der deutlich intensivere Tierverkehr aber auch das höhere Alter der Tiere sein, begünstigende Faktoren, die bereits in jüngeren Studien identifiziert wurden (Battisti et al. 2010, Broens et al., 2011).

Beim Vergleich der beiden Methoden zur Luftkeimsammlung stellte sich das Impingement als sensitiveres Verfahren heraus, bei dem signifikant häufiger MRSA in der Luft gefunden wurde als mittels der Filtration. Die mittlere Keimkonzentration von MRSA lag mit $257 \text{ KbE} / \text{m}^3$ für das Impingement zwar niedriger als $802 \text{ KbE} / \text{m}^3$ mittels Filtration, dies ist jedoch der Statistik geschuldet und resultiert aus den unterschiedlichen Nachweisgrenzen der beiden Methoden und die Einbeziehung von nur positiven Werten in die Berechnung des geometrischen Mittelwertes. Obwohl die untere Nachweisgrenze des Impingements mit $8 \text{ KbE} / \text{m}^3$ sehr niedrig ist, kann man dabei nicht vollständig ausschließen, dass sich eine geringe MRSA-Konzentration auch in den negativ getesteten Stallluftproben befand. Der Vergleich zur Luft-Gesamtkeimzahl sowie zu der Konzentration an *Staphylococcus spp.* in den Luftproben zeigt hingegen, dass MRSA nur einen sehr geringen Teil der Keimflora der Stallluft ausmacht.

Höchstwahrscheinlich stellt der Staub die Hauptquelle für diese luftgetragenen MRSA dar, da die Keime bei positivem Nachweis in Luftproben auch stets in parallel entnommenen Staubproben nachgewiesen werden konnten. Neben der Übertragung von MRSA durch direkten Kontakt scheint es demnach möglich, dass sich die Keime, abhängig vom

Lüftungssystem, über den Luftweg im gesamten Stallgebäude ausbreiten und nach Anreicherung im Stallstaub bis zu einer ausreichend hohen Konzentration, nach Tierkontakt dann weitere Tiere besiedeln können.

Auch in den anderen Umgebungsproben, wie Sockentupfern, Sammelkot und Futter konnten MRSA regelmäßig detektiert werden, wobei die Nachweishäufigkeiten in Kot und Futter geringer waren als im Sockentupfer, der *de facto* eine kombinierte Sammelkot/Sammelstaub-Probe darstellt. Da es sich bei den untersuchten Kotproben um Sammelproben handelte, wird es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit einerseits um eine sekundäre Kontaminationen mit MRSA aus der Umgebung, insbesondere aus Staub handeln. Ähnlich verhält es sich bei den Futterproben, welche direkt aus den Trögen entnommen wurden und somit mit Sicherheit ebenfalls durch Staub und die Tiere selbst kontaminiert worden sind. Nichtsdestotrotz stellt die Ausscheidung von MRSA über den Kot vermutlich eine weitere Emissionsquelle von MRSA in der Schweinhaltung dar. So konnten Szabo et al. 2011 laMRSA ST398 nach experimenteller, intranasaler Kolonisierung/Infektion regelmäßig mit hohen Keimzahlen auch aus Rektalkot isolieren. Als weiteres Indiz für Fäzes als mögliche Emissionsquelle ist die Tatsache zu werten, dass im bearbeiteten Teilprojekt die MRSA-Rate bei den untersuchten Sammelkotproben bei gleicher Staubbelastung mit 73 % deutlich höher lag als bei den parallel untersuchten Futtersammelproben (37 %).

Insgesamt zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass in der Tierumgebung und in der Stallluft von MRSA-positiven Schweinemast- und -zuchtbetrieben La-MRSA sehr häufig isoliert werden kann. Diese Lokalisationen stellen einerseits potentielle Kolonisations- bzw. Infektionsquellen für die Schweine und auch die Beschäftigten dar, darüber hinaus aber, insbesondere als Stallabluft und Gülle, auch Emissionsquellen für MRSA in die Stallumgebung.

MRSA bei Schweinen

In den untersuchten Herden mit positivem MRSA-Status, war die Prävalenz von laMRSA sowohl in den Proben des Nasenvorhofes als auch in denen der Haut mit 78,7 % bis 88,3 % sehr hoch. Die MRSA-Prävalenz in den Tierproben korrelierte dabei schwach mit der Anzahl positiver Luftproben im Stall. Dieser Zusammenhang könnte wechselseitig sein, d.h. mehr MRSA-positive Schweine bedingen ein erhöhtes Vorkommen der Keime in der Umgebung und umgekehrt.

Auch hier war die Prävalenz der Methicillin-resistenten Keime in den Tierproben in Schweinemastbetrieben signifikant höher als in Zuchtbetrieben. Das könnte an einem

höheren Tieraustausch in den Mastbetrieben liegen, da zu jeder neuen Mastperiode neue Tiere, teils aus wechselnden Herkünften, eingestallt werden. Neuere Studien belegen ein erhöhtes Risiko der Einschleppung von laMRSA bei vielen verschiedenen, potentiell MRSA-positiven Herkünften der Ferkel (Broens et al., 2011). Nach Battisti et al. 2010 spielt zudem die Herdengröße eine Rolle, wobei große Herden und das waren in dieser Studie die Mastbestände, ein höheres Risiko tragen.

Sowohl in den Isolaten der Tierproben als auch in denen der Stallluft konnten vorrangig die *Spa*-Typen t011 und t034 nachgewiesen, wobei regelmäßig dieselben *Spa*-Typen den Isolaten aus den Tier- und den Luftproben zugeordnet werden konnten. Diese *Spa*-Typen werden überwiegend dem Sequenztyp ST398 zugeordnet, welcher in Nutztierbeständen vermehrt gefunden werden kann. Diese MRSA werden demnach zu den livestock associated MRSA gezählt. Das Vorfinden der gleichen *Spa*-Typen in Tier- und Tierumgebungsproben lässt eine wechselseitige Kontamination von Tier und Umgebung vermuten. Die anderen gefundenen *Spa*-Typen t108, t1451 und t1255 wurden ebenfalls schon in Proben von Schweinen gefunden (de Neeling et al., 2007; Kock et al., 2009; Overesch et al., 2011).

3.2.2 MRSA in der Abluft und Umgebung von Schweinemast- und -zuchtbeständen

Im Rahmen der durchgeführten Longitudinalstudie konnte in der Stallluft und im Stallstaub von allen untersuchten Beständen zu jedem Untersuchungszeitpunkt laMRSA nachgewiesen werden.

In der Außenluft der Abluftfahne der untersuchten Ställe hingegen war ein Nachweis von laMRSA jedoch nur sporadisch möglich. Das liegt höchstwahrscheinlich an dem großen Verdünnungseffekt, den die ausströmende Stallabluft nach Verlassen des Stalls erfährt.

Demgegenüber konnten laMRSA auf den Lee-seitig, d.h. in der Abluftfahne des Stalles/Bestandes gelegenen Oberflächen der Stallumgebung, die mittels Sockentupfern beprobt wurden, regelmäßig gefunden werden, wobei dort eine Detektion bis zur maximal untersuchten Entfernung von 500 Metern möglich war. Dies bestätigt die Ergebnisse von Harper et al. 2010. Eine laMRSA-Kontamination des Bodens durch die Abluft anderer Tierställe konnte nach dem Stand des Wissens bei Projektstart weitestgehend ausgeschlossen werden, da im Umkreis von 1000m kein anderer Betrieb lag. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, in der bei Schweine- und Mastgeflügelbeständen auch bei der maximal untersuchten Entfernung von 500m vom Stall mutmaßlich luftgetragene MRSA nachgewiesen werden konnten, können als Emissionsquelle für die positiven MRSA-

Nachweise auch Nachbarbestände nicht sicher ausgeschlossen werden. Etwaige künftige Untersuchungen sollten sich daher der Frage nach der maximalen Austragsstrecke für laMRSA aus intensiven Schweine- und Mastgeflügelhaltungen widmen. In diesem Kontext stellt sich auch die Frage nach einem möglichen Eintrag von laMRSA über die Zuluft bei näher zueinander gelegenen intensiven Tierhaltungen, insbesondere in viehdichten Regionen.

Auch der Austrag von laMRSA-haltiger Gülle stellt offenbar eine weitere Emissionsquelle für laMRSA in der Umgebung von Schweinehaltungen dar. Zwar konnte (nach Stand des Wissens bei Projektstart) für die Mehrzahl der positiven Oberflächenproben eine durch Gülleausbringung hervorgerufene MRSA-Kontamination der Stall-Umgebung weitgehend ausgeschlossen werden, da nach Auskunft der Betriebsleiter (zumindest für längere Zeit) keine Gülle auf diese untersuchten Flächen ausgebracht wurde oder die beprobten Flächen keine Feldflächen waren. Eine mögliche Verschleppung von laMRSA fäkalen Ursprungs aus dem Tierstall über Transportfahrzeuge, Personen, Wildtiere oder auch Insekten (wie in der vorliegenden Untersuchung exemplarisch gefunden) kann jedoch ebenso wenig ausgeschlossen werden wie eine sehr hohe Umwelttenazität emittierter laMRSA mit hoher Persistenzdauer.

Die übereinstimmenden Ergebnisse der *Spa*-Typisierung zeigen wiederum, dass, unabhängig vom Austragsweg, ein starker Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von laMRSA im Tierstall und in dessen Umgebung anzunehmen ist. Weiterführende Untersuchungen mit anderen, besser diskriminierenden Methoden, wie Pulsfeldgelelektrophorese oder Micoarray, erscheinen hier allerdings notwendig, um diese Hypothese zu bestätigen, und um der Frage nachzugehen, inwiefern bestimmte MRSA-Geno- und/oder Phänotypen vermehrt über die Abluft und/oder die Fäzes ausgetragen werden bzw. eine erhöhte Umwelttenazität aufweisen.

Der Vergleich der Proben zwischen Luv- und Lee-Seite offenbarte hier große Unterschiede. So konnten signifikant häufiger laMRSA auf der windabgewandten Stallseite gefunden werden, was die Annahme eines aerogenen MRSA-Austrags aus dem Tierstall untermauert und den starken Einfluss der Windrichtung unterstreicht. Positive Proben der Luv-Seite könnten wiederum durch einen vorangegangenen Wechsel der Windrichtung mit erfolgter Deposition der Keime erklärt werden. Bei Betrachtung der Ergebnisse der unterschiedlichen Probennahme-Zeitpunkte fällt zudem auf, dass im Sommer in signifikant mehr Proben der MRSA-Nachweis möglich war. Mögliche Erklärungen hierfür wären einerseits die, verglichen mit dem Rest des Jahres, deutlich höheren Sommer-Lüftungsraten. Andererseits stellt sich die Frage nach der Tenazität (Überlebensfähigkeit) aerogen ausgetragener und dann deponierter laMRSA auf verschiedenen Bodenflächen und unter verschiedenen klimatischen

Bedingungen. Für solch eine erhöhte Umwelt-Tenazität, kombiniert mit einer Anreicherung in der Umwelt infolge des ständigen Austrags, sprechen neben der ohnehin bekannten hohen Tenazität von *S. aureus* die zahlreichen MRSA-positiven Sockentupferergebnisse der Stallumgebung bei zeitgleich MRSA-negativen Außenluftproben sowie die häufigen MRSA-Nachweise auch auf der Luv-Seite der Ställe, da die deponierten laMRSA auf dieser dem Wind zugewandten Seite wahrscheinlich bereits deutlich länger auf den beprobten Flächen deponiert waren als auf der Lee-Seite, zu der hin im Probenahmezeitraum ein permanenter MRSA-Austrag erfolgte.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass es aus Schweinemast- und -zucht-Beständen heraus regelmäßig zu aerogenen und fäkalen Emissionen von livestock associated MRSA kommen kann.

3.2.2 MRSA innerhalb von Geflügelmastbeständen

MRSA in der Stallluft und der Tierumgebung

In sieben von neun Beständen wurde MRSA in der Stallluft gefunden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen in den Schweinebetrieben, wo mit Hilfe des Impingements signifikant höhere Nachweishäufigkeiten von aerogenen MRSA als mittels Filtration ermittelt wurden, konnte dies für die Geflügelbestände nicht bestätigt werden. Die mittleren MRSA-Konzentrationen der positiven Luftproben lagen beim Vergleich mit den Schweinebeständen jedoch in der gleichen Größenordnung.

Auch bei Gegenüberstellung aller Probenmatrices in der Tierumgebung zueinander wurden bei den Geflügelbeständen keine signifikanten Unterschiede ermittelt, ebenso wenig wie beim Vergleich von Luft- und Tierumgebungsproben zwischen Broiler- mit Putenbeständen, wobei jedoch darauf hinzuweisen ist, dass die zu Projektstart festgelegte Probenzahl hier geringer war als die der Schweinebetriebe.

Jedoch weisen die untersuchten Mastgeflügelbestände verglichen mit den Schweinebeständen, und hier insbesondere mit Schweinemastbeständen, deutlich geringere MRSA-Kontaminationsraten in der Tierumgebung auf. Insbesondere MRSA-positive Fäzesproben als mögliche laMRSA-Emissionsquellen wurden in Geflügelmastbeständen in deutlich geringerem Maße gefunden (73,3 % Mastschwein vs. 22,2 % Mastgeflügel).

Es lässt sich jedoch resümieren, dass in Geflügelmastställen und -durchgängen mit positivem MRSA-Status dieser Keim regelmäßig in der Tierumgebung und auch in der Stallluft gefunden werden kann. Somit ist, wie bei Schweinehaltungen auch, eine Ausbreitung der

Mikroorganismen innerhalb der Tiergruppe dieses Durchganges sehr wahrscheinlich und es besteht das Risiko einer Keimverschleppung durch den gesamten Betrieb, beispielsweise durch Anhaften von Staub- bzw. Einstreuresten an stallübergreifend verwendeten Geräten oder Kleidung sowie das Risiko von MRSA-Emission durch MRSA-haltige Stallluft sowie MRSA-haltige Einstreumaterialien.

MRSA beim Mastgeflügel

In vielen Haut- und Choanen-Proben konnte laMRSA gefunden werden. Die Prävalenzen waren hierbei mit 63,9 % - 66,7% für die gepoolten Proben und 56,7 % - 64,8 % für die Einzelproben etwas niedriger als bei den zuvor untersuchten Schweinebetrieben.

In einem Broilerbestand waren alle Proben der Tiere, wie auch die meisten anderen Proben, MRSA-negativ. Hier konnte der Keim nur im Staub und in der Stallluft gefunden werden. Bei weiteren Broilerbeständen konnte ein Wechsel des MRSA-Status des Bestandes von „positiv“ zu „negativ“ zwischen zwei aufeinanderfolgenden Mastdurchgängen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu waren in einem anderen Broilerbestand der Querschnittsstudie insgesamt nur wenige Proben der Choanen der Masthähnchen MRSA-positiv, während in der Tierumgebung MRSA nicht nachgewiesen werden konnte. In den beprobten Putenmastbeständen hingegen wurde MRSA stets auf den Tieren sowie auch in der Tierumgebung nachgewiesen.

Es zeigt sich also ein sehr variables Bild, wobei sich anhand der Daten der Querschnittsstudie auf keine Haupteintragsquelle bzw. Hauptemissionsquelle schließen lässt.

Die Frage nach der Ursache hierfür war nicht Gegenstand des durchgeführten Entscheidungshilfe-Projekts und kann daher nicht vollumfänglich beantwortet werden, da z.B. nur bei Broilern frisch eingestellte Küken untersucht wurden. Jedoch sind diese beobachteten Status-Wechsel im Kontext mit den (negativen) MRSA-Befunden in der Tierumgebung ein Indiz dafür, dass durch effektive Hygienemaßnahmen der „MRSA-Druck“ in der Tierumgebung soweit gesenkt werden kann, dass somit eine MRSA-Kolonisierung/Infektion von MRSA-negativen Eintagsküken in einem im vorherigen Mastdurchgang MRSA-positiven Hähnchenmaststall verhindert werden kann. Zugleich könnte man die gefundenen Statuswechsel beim Broiler (die so in keiner der Studien beim Schwein innerhalb des Entscheidungshilfe-Verbundvorhaben und auch nicht bei den Putenbeständen gefunden wurden) auch als Indiz dafür werten, dass ein maßgeblicher Eintrag von laMRSA über zugekaufte Küken beim Broiler in geringerem Maße als beim Schwein erfolgt. Für die Pute können Aussagen hierzu leider nicht getroffen werden, da die ursprünglich geplanten

longitudinalen Untersuchungen auf die Emissionsproblematik fokussierten und hier keine Untersuchung von Eintagsküken erfolgte.

Neben den eventuellen tierartlichen Unterschieden (Huhn vs. Pute) ist vor allem aber auch zu diskutieren und gegebenenfalls künftig zu untersuchen, inwieweit bestimmte MRSA-Genotypen oder auch verschiedene Masthähnchen-Zuchtlinien für dieses unterschiedliche Kolonisierungs- und Kontaminationsmuster verantwortlich zu machen sind.

3.2.3 MRSA in der Abluft und Umgebung von Geflügelmastbeständen

Die Untersuchungen der durchgeführten Longitudinalstudie zeigten auch für das Geflügel das Auftreten von laMRSA in der Umgebung der Tierställe. Vor allem in Proben der Bodenoberfläche, aber vereinzelt auch in Außenluft-Proben der Abluftfahne wurden laMRSA nachgewiesen. Dabei wurden die Keime signifikant häufiger auf der windabgewandten Seite bis zur maximal untersuchten Entfernung von 500m nachgewiesen. Dies lässt ähnlich wie bei den untersuchten Schweinebeständen eine aerogene laMRSA-Emission aus Mastgeflügelställen mit anschließender Deposition in der Stallumgebung vermuten. Durch die im allgemeinen hohe Tenazität von Staphylokokken ist ein Überleben der Keime in der Umwelt, auf den verschiedenen Bodenoberflächen und auch bei unterschiedlichen Witterungsbedingungen wahrscheinlich, was die Nachweise auf dem Boden unabhängig von Nachweises in der Außenluft erklärt. Zudem wird das Detektionslimit der Luftkeimsammler durch den hohen Verdünnungseffekt in der Außenluft höchstwahrscheinlich unterschritten, während es andererseits, in Abhängigkeit von der ausgetragenen MRSA-Menge und der Umwelttenazität von MRSA zu einer Anreicherung der deponierten laMRSA in der Stallumgebung kommen dürfte.

Im Gegensatz zu den Schweinebeständen, lagen die untersuchten Geflügelställe allerdings sämtlich in sehr viehdichten Regionen, so dass die Abwesenheit anderer Stallungen im Umkreis von 1km nicht sichergestellt werden konnte. Dies bedeutet, dass, wie bereits vorstehend zu den Schweinemastbetrieben diskutiert, theoretisch auch MRSA aus anderen als den beprobten Ställen emittiert wurden und je nach Windrichtung auch direkt im Umkreis des untersuchten Stalls sedimentiert sein könnten. Jedoch sprechen die bisher vorliegenden Typisierungsergebnisse, die ja eine weitgehende Übereinstimmung der *Spa*-Typen bei den Isolaten aus den Ställen und den Isolaten aus der jeweiligen Stallumgebung zeigen, dafür, dass die in der Stallumgebung isolierten MRSA tatsächlich größtenteils in den beprobten Geflügelställen ihren Ursprung haben.

Bei den longitudinalen Untersuchungen der beiden Broilerbestände fiel auf, dass kurz nach Einstellung der Tiere, am Masttag 2, sowohl alle Proben der 60 untersuchten Küken als auch alle Proben innerhalb der Ställe MRSA-negativ waren. In Proben der Stallgebäudeumgebung konnten hingegen bereits zu diesem ersten Probenahmezeitpunkt schon die gesuchten Keime nachgewiesen werden. Bei denjenigen Broilerbetrieben, die nach dem initialen positiven MRSA-Screening in vorherigen Mastdurchgang dann im Folgedurchgang im Stall negativ waren und die deshalb in keine Studie aufgenommen wurden, konnten die Mikroorganismen zwar nicht im Stall oder auf den Tieren, wohl aber in Sockentupfern der Stall-Umgebung gefunden werden. Auch dies spricht für die hohe Umwelttenazität von La-MRSA in der Umgebung von Schweine- und Mastgeflügelställen.

Diese Ergebnisse deuten aber ebenfalls auf den schon diskutierten Wechsel des MRSA-Status zwischen einzelnen Mastdurchgängen beim Masthähnchen hin. In der Umgebung der Tierställe jedoch verweilen die Erreger bzw. reichern sich eventuell auch an und stellen somit eine mögliche Eintragsquelle in MRSA-negative Mastdurchgänge dar. Als mögliche Eintrittspforten ist zum einen die Frischluft selbst denkbar, zum anderen kontaminierte Materialien oder kolonisierte Personen.

Resümierend lässt sich, so wie auch für die untersuchten Schweinehaltungen feststellen, dass aus Masthähnchen- und Putenmastbeständen heraus regelmäßig livestock associated MRSA auf aerogenem und wahrscheinlich auch fäkalen Weg emittiert werden und diese so eine Immissionsquelle für benachbarte Tierhaltungen und Anwohner darstellen können.

4. Zusammenfassung

Ziel dieses Projektes war die Erfüllung eines Entscheidungshilfebedarfs des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), wissenschaftliche Untersuchungen zum Vorkommen von livestock assoziierten MRSA Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* (laMRSA) in der Stallluft und Abluft von Tierhaltungen durchzuführen.

Dazu wurden Felduntersuchungen in konventionellen, ausschließlich laMRSA-positiven Schweine- sowie Mastgeflügelhaltungen durchgeführt, die eine Abschätzung des Übertragungsrisikos luftgetragener laMRSA-Stämme innerhalb eines Betriebes, auf andere Tierbestände oder Anwohner in der Umgebung von Nutztierställen erlauben.

In Querschnitts-Untersuchungen wurden laMRSA-Emissionsquellen innerhalb des Stalls (bei den Tieren und der Tierumgebung) ermittelt sowie die Keime qualitativ und quantitativ in der Stallluft bestimmt. In Longitudinal-Untersuchungen wurde, parallel zu den lufthygienischen Untersuchungen im Stall, das Vorkommen von laMRSA auf der Luv- und Lee-Seite des Stallgebäudes in Außenluftproben und auf Bodenoberflächen in unterschiedlichen Entfernungen bis zu 500m untersucht.

In 23 von 27 untersuchten Schweinebeständen (85,2%) konnte laMRSA in der Stallluft nachgewiesen werden. Der Staub ist dabei höchstwahrscheinlich Hauptquelle dieser luftgetragenen laMRSA, da die dazugehörigen, parallel entnommenen Staubproben ebenfalls stets MRSA-positiv waren. Bei den Geflügelbeständen konnten laMRSA bei 7 von 9 (77,8 %) der innerhalb der Querschnitts-Studie untersuchten Bestände in der Stallluft nachgewiesen werden. Auch Sammelkotproben waren, insbesondere in Mastschweinebeständen in hohem Maße laMRSA positiv.

Im Rahmen der Longitudinal-Studie wurden sechs ausgewählte Schweinebestände viermal über ein Jahr hinweg untersucht. Bei den Geflügelbeständen wurden 5 Puten- sowie 2 Broilerbestände mehrmalig innerhalb eines Mastdurchganges beprobt. Dabei konnte der Erreger bei allen Schweine- und Geflügelbeständen regelmäßig auf Bodenoberflächen der Stallumgebung bis zur maximal untersuchten Entfernung von 500m auf der Lee-Seite gefunden werden. In drei Schweine- und zwei Putenbeständen war zudem der Nachweis von laMRSA Außenluftproben (bis maximal 150m Entfernung auf der Lee-Seite) möglich.

Mittels *Spa*-Typisierung ausgewählter Isolate wurden in den Ställen und deren Umgebung jeweils identische MRSA-Typen ermittelt, die vorrangig der Gruppe der livestock-assoziierten MRSA des Sequenztyps CC398 zugeordnet werden.

Eine luftgetragene Verbreitung von laMRSA sowohl im Bestand als auch eine aerogene und fäkale Emission mit anschließender Deposition in der Stallumgebung von Schweine- und Mastgeflügelbeständen ist somit anzunehmen. Daher ist neben dem Übertragungsrisiko luftgetragener MRSA-Stämme innerhalb eines Betriebes auch mit Immissionen im Bereich anderer Tierbestände oder bei Anwohnern in der unmittelbaren Umgebung von laMRSA-positiven Nutztierställen zu rechnen.

Besonders die Überlebensfähigkeit dieser deponierten Keime in der Stallumgebung unter verschiedenen Umweltbedingungen, die maximalen Transmissionsentfernungen sowie gezielte Maßnahmen zur Emissionsminderung von laMRSA in Nutztierstallungen sind in diesem Zusammenhang von maßgeblicher Bedeutung und sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Änderungen während der Projektphase

Inhaltlich haben sich während der zurückliegenden Projektphase folgende Änderungen bzw. Anpassungen ergeben:

Die avisierten Querschnittsuntersuchungen in Schweinebeständen sowie die Langzeituntersuchungen, welche pro Schweinebestand einmal im Quartal über ein Jahr hinweg erfolgten, wurden gemäß Projektplan in 6 Beständen (2 Zucht- und 4 Mastbestände) vollumfänglich durchgeführt.

Ein weiterer Fokus des Projektes lag auf der Untersuchung von Geflügelmastbeständen. Da sich hier die Bestandssuche und –auswahl infolge deutlich niedrigerer MRSA-Nachweise beim Screening gepaart mit einer deutlich geringeren Kooperations-Bereitschaft der wenigen MRSA-positiven Betriebe zur Teilnahme an der Studie als wesentlich schwieriger als beim Schwein herausstellte, wurden Anpassungen im Studiendesign notwendig und auf entsprechenden Antrag hin die Laufzeit für dieses Teilprojekt um drei Monate verlängert. Insgesamt wurden 13 statt der vorgesehenen 10 Mastgeflügelbestände, davon 6 Broiler- und 7 Putenmastbestände, die beim initialen Screening als MRSA-positiv identifiziert werden konnten, in der Querschnittstudie einmalig untersucht. Hiervon konnten jedoch nur 9 Bestände in die statistische Auswertung der Querschnittstudie einbezogen werden, da sowohl bei den beprobten Putenmastbetrieben als auch bei den Broilerbeständen jeweils zwei Bestände zum beprobten Zeitpunkt (das Screening erfolgte im vorherigen Mastdurchgang) komplett MRSA-negativ waren. Von den ursprünglich 6 im Rahmen der Longitudinalstudie geplanten Beständen wurden 2 Broilermastbestände sowie 5 weitere Putenmastbestände mehrmalig einschließlich deren Umgebung untersucht. Der zeitliche Rahmen der Untersuchungen wurden nach Abstimmung mit dem Projektträger von ursprünglich einmal pro Quartal und somit viermal pro Jahr auf drei- bzw. viermal im Verlauf eines Mastdurchgangs im Broiler- bzw. Putenbestand geändert. Hintergrund dafür war der in den Voruntersuchungen festgestellte, wechselnde MRSA-Status der Bestände zwischen den einzelnen Durchgängen. Das erschwerte die gezielte Messung in einem aktuell laMRSA-positiven Durchgang, da v.a. bei der Broilermast die Mastdauer mit ca. 35 – 40 Tagen sehr kurz ist. Zudem bliebe ohne dieses modifizierte Vorgehen die Frage nach der Herkunft bzw. der Einschleppung der Keime in einen Betrieb, der in einigen Durchgängen offensichtlich

MRSA-negativ bleibt, unbeantwortet. Zur Bestandsauswahl (MRSA-Screening) wurden die Broilermastbestände dafür im letzten Viertel der vorherigen Mastperiode beprobt und bei einem MRSA-positiven Ergebnis wurde der anschließende Mastdurchgang innerhalb der Longitudinalstudie direkt nach Einstallung, nach ca. 14 Tagen und nach ca. 28 Tagen untersucht. Zur Auswahl der Putenbestände wurde genauso vorgegangen, zusätzlich wurde hier der Bestand ca. 1-2 Wochen nach Einstallung erneut gescreent. Bei positivem Ergebnis wurde derselbe Bestand vier Mal bis zum Mastende (ca. 19 Wochen) umfangreich untersucht. Insgesamt wurden so 26 statt der ursprünglich im Rahmen der Longitudinaluntersuchungen geplanten 24 Bestandsuntersuchungen durchgeführt.

Die Ermittlung von 3 MRSA-positiven Kälbermastbeständen für die einmalige Querschnittsuntersuchung war trotz großen organisatorischen Aufwands allerdings nicht möglich. In keinem der 6 gescreenten Bestände war ein Nachweis von laMRSA möglich. Somit wurde nur ein Kälbermaststall, welcher zu einem landwirtschaftlichen Betrieb mit MRSA-positiven Schweinen gehörte, auf Verdacht mit dem kompletten Probenumfang untersucht.

Ursprünglich geplante Ziele/ Neu entstandene Fragestellungen:

Primäres Ziel dieses Entscheidungshilfe-Projektes waren Untersuchungen in Schweine- sowie Mastgeflügelhaltungen, die eine Abschätzung des Übertragungsrisikos luftgetragener MRSA-Stämme innerhalb eines Betriebes, sowie des Immissionsrisikos auf Tierbestände oder Anwohner in der Umgebung von Nutztierställen erlauben.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine luftgetragene Verbreitung von laMRSA im Bestand als auch eine aerogene und fäkale Emission mit anschließender Deposition in der Stallumgebung von Schweine- und Mastgeflügelbeständen stattfinden. Zugleich lieferten die Untersuchungen Anhaltspunkte für die Vermutung einer beträchtlichen Umwelt-Tenazität von laMRSA in der Stallumgebung. Darüber hinaus konnte aber zumindest für Masthähnchenbetriebe mehrfach gezeigt werden, dass mit effektiven Hygienemaßnahmen MRSA-kontaminierte Ställe in einer Weise desinfiziert werden können, dass nachfolgend gehaltene Masthähnchen nicht mit laMRSA kolonisiert werden.

Weiterführende Untersuchungen zur Problematik der in dieser Studie aufgezeigten aerogenen und fäkalen laMRSA-Emissionen sollten sich folgenden Punkten widmen:

- der Überlebensfähigkeit (Tenazität) emittierter und deponierter laMRSA in der Stallumgebung unter verschiedenen Umweltbedingungen sowie detaillierter genotypischer Vergleich der in den Beständen zirkulierenden laMRSA mit den aus

diesen Beständen emittierten und in der Stallumgebung zu findenden MRSA um etwaige mit höherem aerogenen Austrag oder höherer Umwelt-Tenazität („Umwelt-MRSA“) identifizieren zu können

- der Abklärung der maximalen Transmissionsentfernungen von laMRSA aus Nutztierhaltungen
- der Abklärung etwaig stattfindender laMRSA-Immissionen in Nutztierhaltungen
- der Evaluierung bzw. Entwicklung effektiver Methoden und Maßnahmen zur Minderung aeroGENER und fäkaler laMRSA-Emissionen.

6. Literaturverzeichnis

Adrian, U., Hilliger, H. G., 1988. Erfahrungen mit 5 Staubmeßmethoden im Schweinestall. *Tierärztl. Umschau* 43, 657-664.

Beard-Pegler, M.A., Stubbs, E. and Vickery, A.M., 1988. Observations on the resistance to drying of staphylococcal strains. *J Med Microbiol* 26 (4), 251-255.

Broens, E.M., Graat, E.A., van der Wolf, P.J., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., van Nes, A., Mevius, D.J., de Jong, M.C., 2011, MRSA CC398 in the pig production chain. *Preventive veterinary medicine* 98, 182-189. Clements, M.O. and Foster, S.J., 1999. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 7 (11), 458-462.

Cuny, C., Kuemmerle, J., Stanek, C., Willey, B., Strommenger, B. and Witte, W., 2006. Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans. *Euro Surveill* 11 (1), 44-47.

de Neeling, A.J., van den Broek, M.J., Spalburg, E.C., van Santen-Verheuevel, M.G., Dam-Deisz, W.D., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E. and Huijsdens, X.W., 2007. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 122 (3-4), 366-372.

Ekkelenkamp, M.B., Sekkat, M., Carpaij, N., Troelstra, A. and Bonten, M.J., 2006. [Endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* originating from pigs]. *Ned Tijdschr Geneeskde* 150 (44), 2442-2447.

Fessler, A.T., Kadlec, K., Hassel, M., Hauschild, T., Eidam, C., Ehricht, R., Monecke, S., Schwarz, S., 2011, Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Applied and environmental microbiology* 77, 7151-7157. Förster, M., Klimpel, K. Mehlhorn, H., Sievert, K., Messler, S., Pfeffer, K., 2007. Pilot study on synanthropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. *Parasitol Res* 101, 243-246

Gibbs, S.G., Green, C.F., Tarwater, P.M., Mota, L.C., Mena, K.D. and Scarpino, P.V., 2006. Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. *Environmental Health Perspective* 114, 1032-1037

Gonzalez, B.E., Rueda, A.M., Shelburne, S.A., 3rd, Musher, D.M., Hamill, R.J. and Hulten, K.G., 2006. Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as the cause of healthcare-associated infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27 (10), 1051-1056.

Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Claus, H., Turnwald, D., Vogel, U., 2003, Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of clinical microbiology* 41, 5442-5448.

Harper, A.L., Ferguson, D.D., Leedom Larson, K.R., Hanson, B.M., Male, M.J., Donham, K.J., Smith, T.C., 2010, An overview of livestock-associated MRSA in agriculture. *Journal of agromedicine* 15, 101-104.

Hartung, J., 1989. Practical aspects of aerosol sampling in animal houses. In: C. Wathes, R.M. Randall (Hrsg.): *Aerosol sampling in animal houses*. EEC-Commission (EUR 11877), Luxembourg, 14-23

- Juhász-Kaszanyitzky, E., Janosi, S., Somogyi, P., Dan, A., van der Graaf-van Bloois, L., van Duijkeren, E. and Wagenaar, J.A., 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis* 13 (4), 630-632.
- Khanna, T., Friendship, R., Dewey, C. and Weese, J.S., 2008. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet. Microbiol.* 128 (3-4), 298-303.
- Kipp, F., Friedrich, A.W., Becker, K., Von Eiff, C., 2004. Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter *Staphylococcus-aureus*-Stämme. *Deutsches Ärzteblatt* 101: A 2045-A 2050
- Klevens, R.M., Morrison, M.A., Fridkin, S.K., Reingold, A., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L.H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J.M., Craig, A.S., Fosheim, G., McDougal, L.K. and Tenover, F.C., 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerg Infect Dis* 12 (12), 1991-1993.
- Kloos, W.E., Schleifer, K.H., Götz, F., 1992. The Genus *Staphylococcus*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. The prokaryotes Vol. II, Springer-Verlag, Berlin: 1369-1420
- Landonlo, J.J., 2000. *Staphylococcus*. In: Encyclopedia of Microbiology, Vol. 4, Second Edition, Academic Press
- Köck, R., Harlizius, J., Bressan, N., Laerberg, R., Wieler, L.H., Witte, W., Deurenberg, R.H., Voss, A., Becker, K., Friedrich, A.W., 2009, Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28, 1375-1382.
- Lee, J.H., 2006. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Vet Microbiol* 114 (1-2), 155-159
- Lighthart, B. and Mohr, A.J., 1987. Estimating downwind concentrations of viable airborne microorganisms in dynamic atmospheric conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1580-1583
- Loeffler, A., Boag, A.K., Sung, J., Lindsay, J.A., Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Smith, H., Stevens, K.B. and Lloyd, D.H., 2005. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J Antimicrob Chemother* 56 (4), 692-697.
- Meemken, D., Cuny, C., Witte, W., Eichler, U., Staudt, R. and Blaha, T., 2008. [Occurrence of MRSA in pigs and in humans involved in pig production--preliminary results of a study in the northwest of Germany]. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 115 (4), 132-139.
- Moon, J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Joo, Y.S., Park, Y.H., Kim, M.N. and Koo, H.C., 2007. Antibigram and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Dairy Sci* 90 (4), 1716-1724.
- Overesch, G., Buttner, S., Rossano, A., Perreten, V., 2011, The increase of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the presence of an unusual sequence type ST49 in slaughter pigs in Switzerland. *BMC veterinary research* 7, 30.
- Pu, S., Han, F. and Ge, B., 2008. Isolation and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Louisiana Retail Meats. *Appl Environ Microbiol.*
- Rountree, P.M., 1963. The Effect of Desiccation on the Viability of *Staphylococcus Aureus*. *J Hyg (Lond)* 61, 265-272.
- Saleh, M., 2006. Untersuchungen zur Luftqualität in verschiedenen Systemen der Geflügelhaltung mit besonderer Berücksichtigung von Staub und Luftkeimen. Dissertation am Lehrstuhl für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- Schulz, J., 2007. Zur Charakterisierung der Ausbreitungsentfernung von Bioaerosolen aus Masthühnerställen. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.
- Shiomori, T., Miyamoto, H. and Makishima, K., 2001. Significance of airborne transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an otolaryngology-head and neck surgery unit. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127 (6), 644-648.
- Sing, A., Tuschak, C. and Hormansdorfer, S., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a family and its pet cat. *N Engl J Med* 358 (11), 1200-1201.
- Szabo, I., Beck, B., Friese, A., Fetsch, A., Tenhagen, B.A., Roesler, U., 2011, Colonization Kinetics of Different Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Types in Pigs and Host Susceptibilities. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 541-548.
- Thorn, P.S., Kiekhafer, M.S., Whitten, P., Donham, K.J., 1992. Comparison of bioaerosols sampling methods in barns housing swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2543-2551

Van Den Broek, I., V. A. N. Cleef, B., Haenen, A., Broens, E.M., PJ, V.D.W., MJ, V.D.B., Huijsdens, X.W., Kluytmans, J.A., AW, V.D.G. and Tiemersma, E.W., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. *Epidemiol Infect*, 1-9.

VWA, 2007. Prevalence of MRSA in meat: factsheet.

Weese, J.S. and Rousseau, J., 2005. Attempted eradication of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* colonisation in horses on two farms. *Equine Vet J* 37 (6), 510-514.

Weese, J.S. and Rousseau, J., 2005. Attempted eradication of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* colonisation in horses on two farms. *Equine Vet J* 37 (6), 510-514.

Weese, J.S., Caldwell, F., Willey, B.M., Kreiswirth, B.N., McGeer, A., Rousseau, J. and Low, D.E., 2006. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. *Vet Microbiol* 114 (1-2), 160-164.

Wenzel R.P., Nettleman, M.D., Jones, R.N., Pfaller, M.A., 1991. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Implications for the 1990s and Effective Control Measures. *The American Journal of Medicine* 91: 3B221S-3B227S
Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C. and Cuny, C., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 13 (2), 255-258.

Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C. and Cuny, C., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 13 (2), 255-258.

Wulf, M., Markestein, A., Van der Linden, F., Vos, A., Klassen, C. and Verduin, C.M., 2008. First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. *Euro Surveill* 13 (9).

Wulf, M.W., Sorum, M., van Nes, A., Skov, R., Melchers, W.J., Klaassen, C.H. and Voss, A., 2008. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clin Microbiol Infect* 14 (1), 29-34.

Wulf, M.W., Tiemersma, E., Kluytmans, J., Bogaers, D., Leenders, A.C., Jansen, M.W., Berkhout, J., Ruijters, E., Haverkate, D., Isken, M. and Voss, A., 2008. MRSA carriage in healthcare personnel in contact with farm animals. *J Hosp Infect* 70 (2), 186-190.