

Förderkennzeichen 2808HS032:

„Molekularbiologische Charakterisierung und Quantifizierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) aus landwirtschaftlichen Nutztieren und vom Tier stammenden Lebensmitteln“

Vorläufiger Abschlussbericht

31. Dezember 2009

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	2
2.	Ziele und Aufgabenstellung des Projekts.....	3
2.1.	Planung und Ablauf des Projektes	5
2.2.	Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde	8
3.	Material und Methoden	12
3.1.	Isolate	12
3.2.	Phäno- und genotypische Untersuchung der Isolate	13
3.2.1	Phänotypie	13
3.2.2	Genotypie (Typisierung und Charakterisierung).....	16
3.3.	Entwicklung von Methoden zur Quantifizierung von MRSA in Lebensmitteln	17
3.3.1	Vergleich von Probengewinnungsverfahren zur quantitativen Bestimmung von MRSA auf der Oberfläche von Schlachtkörpern von Schweinen.....	17
4.	Ergebnisse	23
4.1.	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	23
4.1.1	Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Methicillin-resistenten <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) aus Lebensmitteln	23
4.1.2	Optimierung und Etablierung von Methoden.....	39
4.1.3	Ergebnisse der Antibiotikaresistenztestung, molekularen Typisierung und Charakterisierung der Isolate.....	45
4.2.	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	64
5.	Zusammenfassung	66
6.	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	68
6.1.	Prüfung der Übertragung von MRSA zwischen verschiedenen Tierarten in der Primärproduktion	68
6.2.	Prüfung der Übertragung von MRSA von kolonisierten Tieren auf das Lebensmittel im Rahmen der Lebensmittelgewinnung (Schlachtung, Milchgewinnung).....	68
6.3.	Prüfung des Eintrags von MRSA in die Lebensmittelkette aus potentiellen anderen Quellen (Nachweis von MRSA anderer Typen, die in der Primärproduktion nicht nachgewiesen wurden).....	69
6.4.	Prüfung einer möglichen Selektion spezifischer MRSA durch die Prozessschritte in der Lebensmittelbe- und -verarbeitung	69
6.5.	Prüfung der Verwandtschaft der von Tieren und Lebensmitteln isolierten MRSA mit Stämmen, die von Menschen isoliert werden.....	69
7.	Literaturverzeichnis	70

2. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Gesamtziel des Vorhabens war die Verbesserung der Datengrundlage für die Risikobewertung hinsichtlich einer möglichen Gesundheitsgefährdung des Menschen durch vom Nutztier stammende Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Dieses Ziel sollte erreicht werden durch die umfassende Charakterisierung von Isolaten auf unterschiedlichen Stufen der Lebensmittelkette. Anhand der Ergebnisse dieser Charakterisierung sollte geklärt werden,

- welche Eigenschaften MRSA aufweisen, die auf den verschiedenen Stufen und in unterschiedlichen Bereichen der Lebensmittelkette isoliert werden,
- ob die Isolate und die Eigenschaften sich auf unterschiedlichen Stufen und in unterschiedlichen Bereichen der Lebensmittelkette unterscheiden.

Wissenschaftliche Arbeitsziele des Vorhabens waren

1. Entwicklung und Validierung von Methoden zur Quantifizierung von MRSA in vom Tier stammenden Lebensmitteln
2. Prüfung des Einflusses von technologischen Verfahren auf die Erregerkonzentration im Fleisch
3. Molekularbiologische Charakterisierung von MRSA aus Nutztieren sowie aus Lebensmitteln auf unterschiedlichen Stufen der Lebensmittelkette

Zu 1: Entwicklung und Validierung von Methoden zur Quantifizierung von MRSA in vom Tier stammenden Lebensmitteln

Für die Exposition des Verbrauchers gegenüber MRSA sind sowohl die Häufigkeit des Vorkommens von MRSA entlang der Lebensmittelkette als auch die Menge der im kontaminierten Lebensmittel vorhandenen Erreger entscheidend. Untersuchungen zur Häufigkeit des Vorkommens hatte das BfR im Rahmen seiner Amtsaufgaben bereits in 2008 initiiert und koordiniert. Weitere Untersuchungen wurden im Jahr 2009 durchgeführt. Für die Quantifizierung der Erreger müssen Methoden entwickelt werden, mit denen der Nachweis auch geringerer Erregerkonzentrationen auf Schlachtkörpern und in Lebensmitteln schnell und effizient möglich ist. Dafür liegen bisher keine validierten Methoden vor. Solche Methoden werden auch für die Untersuchung von Lebensmitteln entlang der Lebensmittelkette benötigt, um

dem vorbeugenden Gesundheitsschutz für die Bevölkerung gerecht zu werden. Sie sind darüber hinaus auch erforderlich für die Bewertung verschiedener Prozessschritte in der Lebensmittelverarbeitung sowie für notwendige Kontrollen im Rahmen der Umsetzung von HACCP.

Die zu erarbeitenden Methoden stellen die Grundlage für weitere Anpassungen der Methoden an für Untersuchungen in der Primärproduktion geeignete Matrices dar. Diese sollen im Rahmen weiterer Forschungsvorhaben vorgenommen werden.

Zu 2: Prüfung des Einflusses von technologischen Verfahren auf die Erregerkonzentration im Fleisch

Für die Bewertung möglicher Maßnahmen zur Verringerung der Erregerverbreitung durch Lebensmittel sollen orientierende, experimentelle Studien durchgeführt werden. Mittels der erarbeiteten quantitativen Nachweisverfahren für MRSA wird zu prüfen sein, an welcher Stelle der Prozesskette im Bereich der Fleischbearbeitung eine Erregerverminderung bzw. vermehrte Kontamination erfolgt. Hierbei soll auch geprüft werden, ob bestimmte Verarbeitungsverfahren geeignet sind, vorhandene Kontaminationen im Ausgangsmaterial von Lebensmitteln technologisch zu beherrschen.

Zu 3: Molekularbiologische Charakterisierung von MRSA aus Nutztieren sowie aus Lebensmitteln auf unterschiedlichen Stufen der Lebensmittelkette

Im Rahmen seiner Amtsaufgaben hat das BfR umfangreiche Untersuchungen zum Vorkommen von MRSA in der Primärproduktion sowie entlang der Lebensmittelkette initiiert und koordiniert bzw. bereits durchgeführt. Für das bessere Verständnis der epidemiologischen Zusammenhänge und die Beschreibung der Ausbreitungsdynamik dieser MRSA sollen Isolate umfassend phänotypisch, hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften und molekularbiologisch charakterisiert werden. Es soll geprüft werden, ob Isolate verschiedener Herkunft derselben klonalen Linie angehören, oder ob in Subgruppen unterschiedliche Typen mit möglicherweise unterschiedlichen Resistenzmustern nachgewiesen werden können. In einem Folgeschritt soll dann erforscht werden, welche Einflussfaktoren die aufgedeckten Verteilungsmuster erklären können. Betrachtet werden sollen Isolate aus:

- den verschiedenen Bereichen der Primärproduktion (Schweinezucht und Schweinemast, Geflügelproduktion, Rinderproduktion (Milchproduktion, Kälber- und Rindermast)); sowie

- von Tieren stammenden Lebensmitteln, die auf unterschiedlichen Stufen der Be- und Verarbeitung gewonnen wurden.

Anhand der molekularbiologischen Ergebnisse sollen dann die epidemiologischen Zusammenhänge geprüft werden, hinsichtlich

- der Übertragung von MRSA zwischen verschiedenen Tierarten in der Primärproduktion,
- der Übertragung von MRSA von kolonisierten Tieren auf das Lebensmittel im Rahmen der Lebensmittelgewinnung (Schlachtung, Milchgewinnung),
- dem Eintrag von MRSA in die Lebensmittelkette aus potentiellen anderen Quellen (Nachweis von MRSA anderer Typen, die in der Primärproduktion nicht nachgewiesen wurden),
- einer möglichen Selektion spezifischer MRSA durch die Prozessschritte in der Lebensmittelbe- und -verarbeitung,
- der Verwandtschaft der von Tieren und Lebensmitteln isolierten MRSA mit Stämmen, die von Menschen isoliert werden,

Im Rahmen dieses Arbeitsziels bedurfte es zudem der Optimierung und Neuetaблиerung von Methoden. So wurde einerseits das bisher standardmäßig eingesetzte qualitative selektive Nachweisverfahren modifiziert und hinsichtlich des Kosten-Nutzen-Effektes optimiert. Andererseits wurden molekularbiologische Methoden zur Typisierung (mittels Pulsfeldgelelektrophorese) und Charakterisierung der Isolate entwickelt bzw. etabliert. Schließlich wurde ein international abgestimmtes Plattenformat für die Ermittlung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Bouillon-Mikrodilution erarbeitet, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

2.1. Planung und Ablauf des Projektes

Die Bewilligung des Projektes durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung erfolgte mit Schreiben vom 02.12.2008. In der Folge wurden im BfR entsprechende Stellenbesetzungsverfahren initiiert. Durch die im Rahmen der Vergabe solcher Stellen einzuhaltenden Fristen konnten entsprechende Mitarbeiter/innen mit zeitlichem Verzug eingestellt werden. Dadurch wurde zu Beginn des Projektes der Zeitplan nicht immer eingehalten. Dies konnte jedoch im Laufe des Projektes durch die Verpflichtung zusätzlicher Mitarbeiter/innen aufgeholt werden.

Eine Übersicht über den geplanten Projektablauf gibt Tabelle 1 wieder. Die Struktur des Projektes sah zwei Arbeitsstränge vor.

Der eine Arbeitsstrang behandelte die Untersuchungen zur Quantifizierung von MRSA in Matrices. Hierbei lag, wie schon bei der Antragstellung beschrieben, der Schwerpunkt zunächst bei der Etablierung und Validierung von Methoden zur Quantifizierung. Im Anschluss wurden dann exemplarische Untersuchungen an Lebensmittelmatrices inklusive Pilotstudien zum Einfluss technologischer Verfahren durchgeführt.

Der zweite Arbeitsstrang war gekennzeichnet durch die Charakterisierung von MRSA Isolaten, die im Rahmen verschiedener Projekte und amtlicher Untersuchungen aus unterschiedlichen Matrices in unterschiedlichen Bereichen sowie auf unterschiedlichen Stufen der Lebensmittelkette gewonnen wurden. In diesem Bereich mussten ebenfalls Methoden optimiert und z.T. neu etabliert werden. Die Typisierung der Isolate erfolgte hingegen nach international akzeptierten Methoden, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen in anderen Mitgliedsstaaten zu gewährleisten. Dabei wurden sowohl Isolate einbezogen, die zum Zeitpunkt des Projektbeginns bereits im BfR vorlagen als auch solche, die im Projektzeitraum gewonnen wurden. Die im Projektzeitraum gewonnenen Isolate stammten überwiegend aus amtlichen Untersuchungen, die im Rahmen des nationalen Stichprobenplans nach AVV Zoonosen Lebensmittelkette (vom 11. Juli 2008, BAnz S. 1578) durchgeführt worden waren. Sie beinhalteten aber auch Isolate aus wissenschaftlichen Kooperationen des BfR mit Universitäts- und Landesuntersuchungseinrichtungen.

Tabelle 1: Projektplan gemäß Antragstellung

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Etablierung des Teams												
2	Entwicklung und Etablierung der quantitativen Nachweismethoden						Metho- den- beschrei- bung						
3	Exemplarische quantitative Untersuchungen an Lebensmitteln												Aus- wertung
4	Etablierung weiterer molekularbiologischer Methoden												
5a	Molekulare Charakterisierung der Isolate aus 2008												Aus- wertung
5b	Molekulare Charakterisierung der Isolate aus 2009												Aus- wertung
6	Epidemiologische Analysen												Aus- wertung
7	Erstellung Abschlussbericht												

2.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

MRSA sind häufige Erreger nosokomialer Infektionen (Hospitalismusinfektionen) in der Humanmedizin. In den letzten drei Jahren ist eine Fülle von Untersuchungen zum Vorkommen von MRSA bei Haus- und Nutztieren veröffentlicht worden. Auch vom Tier stammende Lebensmittel wurden positiv auf MRSA getestet. Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden MRSA als Zoonoseerreger klassifiziert.

Die zum Zeitpunkt des Projektstarts vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass die meisten bei gesunden Nutztieren vorkommenden MRSA-Stämme einem spezifischen phylogenetischen Klon zugeordnet werden können. Dieser Klon wurde anhand der Ergebnisse der Multi Locus Sequenztypisierung (MLST) als ST398 bezeichnet. Nachweise von MRSA dieses Typs wurden sowohl beim Schwein als auch beim Rind (Mastkälber und Milchkühe), beim Geflügel sowie bei Pferden erbracht. Auch aus vom Tier stammenden Lebensmitteln wurden MRSA diesen Typs isoliert.

Belastbare Daten für die Bewertung dieser Nachweise im Hinblick auf den gesundheitlichen Verbraucherschutz und eine Risikoabschätzung lagen zum Zeitpunkt des Projektstarts jedoch nur lückenhaft vor.

Qualitativer und quantitativer Nachweis von MRSA

Zum qualitativen Nachweis von MRSA entlang der Lebensmittelkette und den diversen Probenmaterialien (u.a. Staub-, Nasentupfer-, Rohfleischproben) wird im internationalen Standard derzeit ein aus mehreren Schritten bestehendes selektives Anreicherungsverfahren angewendet. Dieses sieht zunächst einen Voranreicherungsschritt (Müller-Hinton-Bouillon mit Zusatz von NaCl), gefolgt von einer Selektivanreicherung (mit antibiotischen Zusätzen) und Kultivierung auf einem kommerziellen MRSA-Selektivagar vor. Bis dato wurde dieses Verfahren jedoch lediglich im Hinblick auf die Isolierung von MRSA aus Nasentupferproben vom Schwein und Kalb evaluiert (Graveland et al. 2009), nicht jedoch für Lebensmittelproben. Eine Modifizierung dieses Verfahrens sollte dabei insbesondere hinsichtlich des Kosten-Nutzen-Effektes bei gleich bleibender Sensitivität und Spezifität erfolgen.

Für die quantitative Untersuchung von MRSA im Lebensmittel bzw. auf der Oberfläche von Schlachtkörpern lagen keine publizierten validierten Methoden vor. In der Literatur fanden

sich vorwiegend semiquantitative Angaben, die auf einem Vergleich der Untersuchung von Direktausstrichen der Matrices (z.B. Fleisch) und der Durchführung von Untersuchungen nach Anreicherung basieren. Wurden im Direktausstrich keine Erreger nachgewiesen, wohl aber in der Anreicherung, so wurde dies als geringer Keimgehalt ($<12 - 15$ Kolonie bildende Einheiten (KbE) / 25g) interpretiert (Voedsel en Warenautoriteit 2008).

Die Anforderungen an ein quantitatives Nachweisverfahren sind eine hohe Sensitivität (niedrige Nachweisgrenze) bei gleichzeitig guter Wiederholbarkeit und einer hohen Spezifität. Der quantitative Nachweis muss auch bei vorhandener Begleitflora möglich sein. In den meisten Lebensmittelmatrices und auch auf Schlachtkörperoberflächen ist von einer solchen Begleitflora auszugehen. Ein quantitatives Nachweisverfahren sollte darüber hinaus für die Routinediagnostik geeignet sein, um im Rahmen von Monitoringprogrammen, sowie im Rahmen der Überwachung einsetzbar zu sein.

Neben kulturellen Verfahren, die für den quantitativen Nachweis von Koagulase positiven Staphylokokken einschließlich *Staphylococcus (S.) aureus* in Lebensmitteln etabliert und in der amtlichen Sammlung nach §64 LFGB standardisiert sind, bieten sich auch molekularbiologische Methoden wie z.B. die Real-time PCR an (Goto et al. 2007; Hein et al. 2001; Hein et al. 2005). Hier gibt es bereits etablierte Methoden zur Quantifizierung von *S. aureus* in Lebensmitteln. Weder die kulturellen, noch die nukleinsäurebasierten quantitativen Methoden wurden jedoch bisher an den spezifischen Nachweis von MRSA adaptiert.

Für die Quantifizierung von MRSA in Lebensmitteln mittels kultureller Verfahren bietet sich die Adaptation von für Koagulase positive Staphylokokken etablierten und standardisierten Methoden der amtlichen Sammlung nach §64 LFGB an. Neben der Anpassung dieser Methoden an den spezifischen Nachweis von MRSA, müssen diese Methoden jedoch ggf. auch hinsichtlich der Nachweisverfahren für niedrige Keimzahlen verbessert werden, um so zuverlässige und spezifische Aussagen auch über geringe Erregerkonzentrationen im Lebensmittel und auf Schlachtkörperoberflächen zu ermöglichen.

Für die Quantifizierung von MRSA mittels molekularbiologischer Methoden bedarf es zunächst der Identifizierung geeigneter Nachweisgene, die eine Spezifität sowohl hinsichtlich der Spezies als auch hinsichtlich weiterer spezifischer Eigenschaften gewährleisten, da das für die Resistenz codierende *mecA* Gen auch bei anderen Staphylokokkenspezies vorkommt. Methoden zum Nachweis mit der Real-time PCR sind für die Humanmedizin beschrieben, aber kaum für Proben von Tieren oder für Lebensmittel validiert. Einzelne Untersuchungen zur Validität hatten enttäuschende Ergebnisse (Anderson und Weese 2007)

Quantitative Untersuchungen zum Vorkommen von Staphylokokken auf Schlachtkörpern und möglichen Einflussfaktoren im Rahmen des Schlachtprozesses liegen vor (Spescha et al. 2006). Diese fehlen jedoch für MRSA. Ähnliches gilt für den Einfluss von Verarbeitungsschritten auf die Belastung der Produkte mit MRSA. In Zusammenarbeit mit dem Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Ostwestfalen-Lippe in Detmold hatte das BfR hier erste, qualitative Untersuchungen eingeleitet, deren Ergebnisse aber bei Projektbeginn noch nicht vorlagen.

Molekulare Charakterisierung von MRSA

Für die molekulare Charakterisierung von MRSA steht eine Fülle unterschiedlicher Methoden aus der Humanmedizin zur Verfügung, da der Erreger dort seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts als Erreger von Wundinfektionen, Atemwegserkrankungen und Sepsis gefürchtet ist. Zahlreiche dieser Methoden können auch für die Charakterisierung von MRSA genutzt werden, die vom Tier und aus Lebensmitteln stammen. Derartige Untersuchungsergebnisse wurden bereits vorgelegt. Es konnte gezeigt werden, dass MRSA desselben MLST-Typs (ST398) und identischer *spa*-Typen (basierend auf der Typisierung des für das Protein A von *S. aureus* codierenden Gens *spa*) bei Schweinen, Rindern (Milchkühe und Mastkälber), Pferden, beim Geflügel und in Lebensmitteln nachgewiesen werden können (Graveland et al. 2008; Persoons et al. 2009; Van den Eede A. et al. 2009; Vicca et al. 2008). Neben der Typisierung anhand dieser Gene, erfolgt eine Typisierung der MRSA nach der das Resistenzgen tragenden Genkassette (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, *SCCmec*).

Ein weiteres für die Ermittlung des Verwandtschaftsgrades unterschiedlicher Isolate von MRSA in der Humanmedizin eingesetztes Verfahren, die Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) nach enzymatischer Verdauung der DNA mittels des Enzyms *SmaI*, kann bei MRSA vom Typ ST398 nicht angewendet werden (Bens et al. 2006). Die DNA dieses MRSA-Typs wird von *SmaI* nicht gespalten. Daraus ergab sich auch für den Bereich der molekularen Charakterisierung der MRSA die Notwendigkeit der Weiterentwicklung von Methoden, da die Ermittlung des Verwandtschaftsgrades von hoher Bedeutung für die Aufklärung von Übertragungswegen in der Lebensmittelkette und epidemiologischen Zusammenhängen ist. Untersuchungen zur Charakterisierung des pathogenetischen Potentials von MRSA des Typs ST398 wurden von einer niederländischen Arbeitsgruppe im Rahmen von wissenschaftlichen Tagungen vorgestellt. Die Untersuchungen zeigten, dass von Schweinen

stammende Erreger dieses Typs nur wenige der untersuchten Virulenzgene aufwiesen. Bei anderen aus Lebensmitteln isolierten, eher human-assoziierten MRSA-Typen wurden hingegen mehr Virulenzgene gefunden (Mevius et al. 2008).

3. Material und Methoden

3.1. Isolate

Insgesamt lagen für die Untersuchung Isolate unterschiedlicher Herkunft vor. Dies waren

- Isolate verschiedener Tierarten bzw. deren unmittelbarer Umgebung (Staub)
- Isolate von Schlachtkörpern unterschiedlicher Tierarten (Schwein, Hähnchen, Pute, Rind (Mastkalb))
- Isolate aus Lebensmitteln
 - Fleisch von Schwein, Pute, Hähnchen, Rind und deren Zubereitungen
 - Milch

Die Isolate wurden dem BfR teilweise im Rahmen seiner Amtsaufgaben zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Isolate aus Untersuchungen im Rahmen

- eines freiwillig mit einigen Ländern durchgeführten Nationalen Zoonosen-Stichprobenplans im Vorgriff auf die in 2008 verabschiedete AVV Zoonosen Lebensmittelkette
- des nationalen Zoonosen-Stichprobenplans nach der AVV Zoonosen im Jahre 2009.
- Isolate, die im Rahmen der EU-weiten Grundlagenstudie zum Vorkommen von MRSA in Zuchtschweinebeständen (Entscheidung 2008/55/EG) gewonnen wurden
- der Bestätigung von MRSA-verdächtigen Isolatens aus den Landesuntersuchungseinrichtungen auf dem Wege der Amtshilfe im Rahmen der Tätigkeit als Nationales Referenzlabor

Weiterhin stammten die Isolate aus unterschiedlichen Forschungsprojekten, die in Zusammenarbeit mit Landesuntersuchungseinrichtungen und Universitäten durchgeführt wurden.

Dabei handelte es sich um folgende Isolate:

1. Asservierte Isolate von *Staphylococcus aureus* aus diagnostischen Sektionen von Schweinen aus den Jahren 2004 bis 2007 in der Außenstelle für Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover in Bakum, Niedersachsen.
2. Isolate aus einer Untersuchung zur Prävalenz von MRSA bei Schlachtschweinen zum Zeitpunkt der Schlachtung, die das BfR im Herbst/Winter 2007/2008 mit den Ländern Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen durchgeführt hat (Tenhagen et al. 2009c).

3. Isolate aus einer Untersuchung zur Prävalenz von MRSA in Mastschweinebetrieben, die das BfR in der zweiten Jahreshälfte 2008 in Zusammenarbeit mit 7 Ländern durchführte.
4. Isolate aus Milchviehbetrieben in Baden-Württemberg, die dem BfR durch den Eutergesundheitsdienst der Tierseuchenkasse Baden-Württemberg zur Verfügung gestellt wurden
5. Isolate aus der Frischfleischproduktion eines Betriebes in Westfalen, die dem BfR im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem CVUA in Detmold, NRW, zur Verfügung standen,
6. Asservierte Isolate von *Staphylococcus aureus* aus Milchproben, die dem BfR von der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt wurden.

Alle Isolate wurden in die Sammlung des NRL Staph aufgenommen sowie phäno- und/oder genotypisch untersucht.

3.2. Phäno- und genotypische Untersuchung der Isolate

3.2.1 Phänotypie

Die phänotypische Identifizierung der Isolate als MRSA erfolgte - wo dies noch nicht vor der Einsendung geschehen war, durch Wachstum auf zwei Selektivnährböden (ChromMRSA Agar, Mast Diagnostica, Reinfeld, und MRSA Brilliance Agar, Oxoid, Wesel). Die phänotypische Charakterisierung der Isolate als *Staphylococcus aureus* erfolgte anhand der Koloniemorphologie, des Wachstums auf Schafblutagar, des Hämolyseverhaltens und dem Bildungsvermögen von Koagulase im Röhrchentest.

Resistenztestung

Die phänotypische Untersuchung der Isolate auf ihre Resistenz gegen weitere antimikrobielle Substanzen erfolgte zunächst anhand des Agardiffusionsverfahrens nach CLSI-Standard (CLSI 2006) unter Benutzung kommerzieller Testplättchen (OXOID, Wesel)

Parallel wurden im Rahmen des Projektes Isolate mittels Boullion-Mikrodilutionsmethode (nach CLSI M7-A7, 2006) auf ihre minimale Hemmkonzentrationen unterschiedlicher antimikrobiell wirksamer Substanzen untersucht. Dazu wurden fertig konfektionierte Mikrotiterplatten (TREK Diagnostics Ltd., UK) des Plattenformates NLM4 mit 15 antimikrobiellen

Substanzen eingesetzt. Das Abfüllen, Inkubieren und Ablesen der Mikrotiterplatten sowie das Einhalten der Qualitätsstandards erfolgte nach CLSI-Richtlinien (M7-A7/M37-A3) bzw. Informationen von TREK Diagnostics Ltd. Als Referenzstämme diente der *Staphylococcus aureus* Stamm ATCC 29213. Die zur Bewertung verwendeten cut off Werte sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die Entscheidung, mit welchem Verfahren die Isolate untersucht wurden, hing von der Herkunft der Isolate ab. Isolate aus Projekten, die vor der Etablierung des Plattenformats für die Bouillon-Mikrodilution begonnen worden waren, wurden mit der Agardiffusion untersucht. Spätere Isolate anhand der Bouillon-Mikrodilution. So wurden alle Stämme, die im Rahmen des nationalen Monitoring 2009 nach AVV Zoonosen Lebensmittelkette isoliert wurden, einheitlich mittels Bouillon-Mikrodilution untersucht. Diese Untersuchungen wurden mit den in Tabelle 2 aufgeführten antimikrobiellen Substanzen durchgeführt.

Eine Gruppe von Isolaten (n=105, s.a. 3.2.2.) wurde zusätzlich mittels PCR auf Resistenzgene untersucht. Darunter befanden sich 31 Gene für die Resistenz gegen:

- Methicillin/Oxacillin: *SCCmec*
- Aminoglykoside: *aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia*, *ant(4′)-Ia*, *aph(3′)-IIIa*,
- Tetrazyklin: *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*
- Makrolid-Lincosamide: *ermA*, *ermB*, *ermC*
- Makrolide: *msrA*, *msrB*
- Lincosamide: *linA/linA′*
- Phenicol: *cat pC194*, *cat pC221*, *cat pC223*, *fexA*
- Trimethoprim: *dfrD*, *dfrG*, *dfrS1*, *dfrK*
- Streptogramin: *vatA*, *vatB*, *vatC*, *vgaA*, *vgaB*, *vgaC*, *vgaA*, *vgaB*
- Phenicol/Lincosamid/Oxazolidinon/Pleuromutilin/Streptogramin A Resistenz: *cfr*

Tabelle 2 **Untersuchung von MRSA auf Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen: Verwendete Wirkstoffe und Konzentrationsbereiche**

Wirkstoff		Agardiffusion Wirkstoffgehalt der Plättchen (µg)	Bouillon-Mikrodilution (mg/l)		
			Min	Max	Cut off
CHL	Chloramphenicol	Nicht getestet	2	64	≤16
CIP	Ciprofloxacin	5µg	0,5	4	≤1
CLI	Clindamycin	2 µg	0,25	32	≤1
ERY	Erythromycin	15 µg	0,125	16	≤0,25
FUS	Fusidinsäure	10 µg	2	32	≤2
GEN	Gentamicin	10 µg	0,5	64	≤2
KAN	Kanamycin	30 µg	8	128	≤8
LZD	Linezolid	30 µg	1	4	≤4
MET	Methicillin	5 µg	Nicht getestet		
MUP	Mupirocin	20 µg	1	16	≤2
OXA	Oxacillin	1 µg	1	8	≤2
QUI/DAL	Quinupristin/Dalfopristin	15 µg	0,5	8	≤1
RIF	Rifampicin	5 µg	0,5	8	≤4
SXT	Sulfamethoxazol- Trimethoprim	25 µg	0,25	4	≤2
TEI	Teicoplanin	30 µg	Nicht getestet		
TET	Tetrazyklin	30 µg	1	64	≤1
VAN	Vancomycin	30 µg	2	4	≤2

3.2.2 Genotypie (Typisierung und Charakterisierung)

Die Bestätigung der Isolate aus der phänotypischen Untersuchung als MRSA erfolgte durch die von Poulsen (2003) etablierte Triplex Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Diese PCR weist drei spezifische Gene nach, deren Kombination die Identifikation eines Keims als MRSA zulässt:

- die genuspezifische 16S rDNA
- das speziesspezifische Nuklease-Gen *nuc*
- das die Resistenz gegen Beta-Laktam-Antibiotika vermittelnde Gen *mecA*

Neben der Bestätigungsuntersuchung wurden die Isolate mit weiteren Verfahren näher charakterisiert. Einerseits erfolgte dies, indem Isolate nach international anerkannten Verfahren (*spa*, *SCCmec*, MLST) typisiert wurden. Von diesen Verfahren wurde die *spa*-Typisierung (Shopsin et al. 1999) für alle Isolate angewandt, während die MLST-Typisierung (Enright et al. 2000) nur angewandt wurden, wenn neue *spa*-Typen identifiziert wurden, bei denen abzuklären war, ob sie ebenfalls dem MLST-Typ ST398 zuzuordnen waren. Die Typisierung des *SCCmec* (Zhang et al. 2005) erfolgte ebenfalls bei der überwiegenden Mehrzahl der Isolate. Eine Auswahl von Isolaten wurde weiterhin mittels der im Rahmen des Projekts etablierten PFGE-Methode typisiert (Argudin et al. 2009b).

Neben der Typisierung wurden 111 ausgewählte *S. aureus* Isolate (davon 105 ST398 MRSA und 6 Non-ST398 MRSA) hinsichtlich des Vorliegens von Virulenzfaktoren charakterisiert. Die Isolate stammten aus gesunden und kranken Schweinen, Staub von Schweinebeständen, Milch sowie Karkassen und Fleisch von lebensmittelliefernden Tieren. Mittels PCR wurden die Isolate auf 37 virulenzassoziierte Genen untersucht (Argudin et al. 2009a).

Darunter befanden sich:

- Hämolyse: *hla*, *hly*, *hld*, *hlg*, *hlg*-Variante
- Leukotoxine: *lukED*, *lukPV*, *lukM*
- Exfoliatine: *eta*, *etb*, *etd*
- Toxic shock Syndrom Toxin: *tsst*
- Enterotoxine: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, *seu*
- Marker für Pathogenitätsinseln (PAIs): *ear*, *spIF*, *bsaB*
- Gene des quorum sensing Systems *agr*: *agrI*, *agrII*, *agrIII*, *agrIV*

3.3. Entwicklung von Methoden zur Quantifizierung von MRSA in Lebensmitteln

Da im Bereich der Methodenentwicklung Material und Methoden gewissermaßen Teil des Ergebnisses sind, findet sich der Bericht zu diesem Kapitel bei der Darstellung der Ergebnisse (Kapitel 4.1.1).

3.3.1 Vergleich von Probengewinnungsverfahren zur quantitativen Bestimmung von MRSA auf der Oberfläche von Schlachtkörpern von Schweinen

Ziel der Arbeit war die Etablierung einer Methode zur spezifischen Quantifizierung Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) auf Schlachtkörperoberflächen. Hierfür wurden drei Verfahren der Probenahme auf Schlachtkörpern nach experimenteller Kontamination der Schlachtkörperhälften mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Referenzstamms von MRSA miteinander verglichen. Die Untersuchung erfolgte in jeweils 10 parallelen Versuchsansätzen, bei denen von einem kontaminierten Oberflächenbezirk jeweils ein Nass-Trockentupfer (Verfahren 1), eine Kratzschwammprobe (Verfahren 2) sowie zwei Stanzproben (Verfahren 3) entnommen wurden.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Beprobung von absichtlich mit MRSA kontaminierten Schlachtkörperoberflächen. Die für diese Versuche verwendeten Schlachtkörper waren für den menschlichen Verzehr ungeeignet und stammten aus einem EU-zertifizierten Schlachtbetrieb und wurden durch das Institut für Fleischhygiene der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

Kontamination der Schlachtkörper mit MRSA

Zur Vorbereitung der Kontamination mit MRSA wurden 20ml der jeweiligen Verdünnungsstufe in einen sterilen Beutel gegeben in dem sich ein steriles Tuch befand (Sodibox, Sodibox SARL). Danach wurde der Beutel bis zur völligen Durchfeuchtung des Tuches durchgeknetet um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Lösung zu erhalten. Im Anschluss wurde das Tuch entnommen und der Erreger durch gleichmäßiges Wischen auf dem mittels Einschnitten gekennzeichneten Areal von 23x23 cm verteilt. Dabei wurde im ersten Versuch mit 4 Schweinehälften (Charge 1) eine Erregerlösung mit einem Keimgehalt von 10^5 KbE/ml verwendet. Im zweiten Versuch mit 4 neuen Schweinehälften (Charge 2) dagegen eine Lösung mit einem Keimgehalt von 10^7 KbE/ml. Jede beprobte Fläche kam dabei einmalig zum Ein-

satz, wobei nach dem Abtrocknen ein Areal an verschiedenen Stellen jeweils mittels Stanz-, sowie Naß-Trocken-Tupfer- und Kratzschwammverfahren beprobt wurde.

Probenahmeverfahren

Die bei der Beprobung verwendeten Metallelemente (Stanzen, Schablonen, Skalpell, Pinzette) wurden nach jeder Verwendung durch Abflammen von aufgebrachtem Alkohol sterilisiert. Der Einsatz der Verfahren, sowie die Weiterverarbeitung der gewonnenen Proben erfolgte in Anlehnung an ISO 17604 bzw. ISO 6887-2.

Die Beprobung wurde mit allen drei Verfahren für jede Kontaminationsstufe 10-mal durchgeführt, wozu jeweils 10 unterschiedliche Areale auf insgesamt 8 Schlachttierkörperhälften kontaminiert wurden. Nach der Beprobung wurden die Schlachtkörper autoklaviert und entsorgt.

1 Naß-Trocken-Tupfer-Verfahren (NTT)

Mittels einer Schablone (V2A-Stahl, 10x10 cm, 1 cm hoher Rand, mit seitlichen Griffen) wurde ein Bereich auf der kontaminierten Fläche festgelegt. Dann wurde mittels eines in 0,9%iger NaCl befeuchteten sterilen Tupfers die durch die Schablone markierte Fläche horizontal und vertikal unter mäßigem Druck abgestrichen, wobei der Tupfer gedreht wurde. Danach wurde der Tupfer abgebrochen und in den Erlenmeyerkolben mit 100ml 0,9%iger NaCl Lösung gegeben, in der er befeuchtet wurde. Das identische Verfahren wurde für das selbe Areal nochmals mit einem trockenen Tupfer angewandt, wonach dieser ebenfalls abgebrochen und in den selben Erlenmeyerkolben wie der erste Tupfer gegeben wurde. Im Erlenmeyerkolben befanden sich zusätzlich zu NaCl-Lösung einige Glasperlen. Vor Entnahme von Probenflüssigkeit wurden die Kolben jeweils 2 min manuell im Kreis geschwenkt, um die an den Tupfern haftenden Erreger in Suspension zu bringen.

2 Kratzschwammverfahren

Für diese Verfahren wurde ebenfalls ein 10x10 cm großes Areal mittels einer Schablone (rostfreies Stahlblech, mit hochgebogenen Kanten als Griff) markiert. Die Tüte die den in 0,9%iger NaCl angefeuchteten Schwamm (TS15-I-NA, Transia GmbH) enthielt wurde mit einem sterilen Skalpell geöffnet. Nun wurde der Schwamm mit der umgewendeten Tüte festgehalten und 10x horizontal bzw. 10x vertikal unter mäßigem Druck über die Untersuchungsfläche geführt. Danach wurde der Beutel wieder zurückgewendet und der Schwamm darin

bis zur Homogenisierung verwahrt. Vor der Homogenisierung im Stomacher für 2 min wurden weitere 90 ml 0,9%iger NaCl Lösung zugegeben.

3 Stanzverfahren

In der markierten, kontaminierten Fläche wurde jeweils zweimal ein Bereich von 5 cm² mit einer Handstanze ausgestanzt und anschließend mittels steriler Pinzette und Skalpell oberhalb der Fettschicht abgehoben. Beide Proben wurden gemeinsam in einen Stomacherbeutel verbracht. Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben dann für je 2 min im Stomacher (Stomacher 400, Colworth) mit 100 ml 0,9%iger NaCl-Lösung homogenisiert.

3.3.2 Exemplarische Untersuchungen zum Wachstum und zur Toxinbildung von MRSA in Hackfleisch

Ziel der Untersuchung war die Erprobung der entwickelten Quantifizierungsverfahren an einer Lebensmittelmatrix. Zu diesem Zweck wurden parallel Untersuchungen mit einem etablierten Verfahren an einem Methicillin-sensiblen *S. aureus* sowie Untersuchungen an einem der seltenen MRSA mit der Fähigkeit zur Bildung von Enterotoxinen durchgeführt um zu prüfen, ob sich dieser Stamm anders verhält als der MSSA. Beide Stämme wurden aus Lebensmitteln isoliert und dem BfR im Rahmen seiner Amtsaufgaben zur Verfügung gestellt. Bei dem MRSA handelte es sich nicht um einen Stamm vom MLST-Typ ST398, da diese nicht über Enterotoxingene verfügten. Es wurde ein Stamm vom Typ ST22 ausgewählt, der aus einer Hackfleischprobe (Mischhack von Schwein und Rind) isoliert worden war.

Keimzahlbestimmung der einzusetzenden Staphylokokken-Kulturen

Die zu untersuchenden Staphylokokken-Stämme (MRSA, MSSA) wurden von Glycerinkulturen auf Schafsblutagar-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht bebrütet. Von diesen Übernachtkulturen wurde je eine Kolonie in 5 ml Hirn-Herz-Glucose Bouillon (BHI) für 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Es erfolgte die Keimzahlbestimmung mittels Verdünnungsreihe. Die Verdünnungsreihe wurde in physiologischer NaCl-Lösung und auf Eis hergestellt. Von den Verdünnungsstufen 10⁻⁵-10⁻⁷ wurden je 100 µl auf *Plate count*-Agar-Platten (PCA) im doppelten Ansatz ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Auszählung der PCA-Platten erfolgte in Anlehnung an die amtliche Methode L 00.00-55 nach dem § 64 LFGB (DIN EN ISO 6888-1).

Keimzahleinstellung der bei 4 °C gelagerten Übernachtskulturen

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, um weiteres Wachstum der Bakterienkulturen zu verhindern.

Um sicher zu gehen, dass nicht bereits exprimierte und sezernierte Toxine in die zu untersuchende Matrix eingebracht werden, wurden die Zellen vor der Keimzahleinstellung mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Hierfür wurde 1 ml der bei 4 °C gelagerten Übernachtskultur abgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 2 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 990 µl aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals für 2 min bei 9000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 990 µl aufgenommen und resuspendiert. Von den gewaschenen Zellen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und das Keimlevel auf 10^{-3} Keime/ g eingestellt.

Hackfleischkontamination

Von kommerziell erworbenem rohem Mischhack (Rind/Schwein) wurden 100 g abgewogen und in sterile Plastikbeutel mit Filtereinsatz sog. Stomacherbeutel überführt. Zu dem abgewogenen Hackfleisch wurde die zuvor eingestellte Keimzahl gegeben und mit 99 ml Aqua bidestilata per Hand von außen durchmischt. Danach wurden 50 g Hackfleisch abgenommen und in einen weiteren Stomacherbeutel überführt. 50 g des kontaminierten Hackfleischs wurden bei 37 °C im Brutschrank für 24 h inkubiert. Die anderen 50 g wurden bis zur Toxinextraktion bzw. Keimzahlbestimmung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert (Negativkontrolle).

Keimzahlbestimmung von kontaminiertem Hackfleisch

Für die Keimzahlbestimmung der inkubierten (37 °C) und nicht-inkubierten (4 °C) kontaminierten Proben, wurden je 25 g abgenommen, in einen Stomacherbeutel gegeben und mit 225 ml Aqua bidest. aufgefüllt. Mit Hilfe eines Stomachers wurden die Proben für 2 min homogenisiert. Diese wurden anschließend für 30 min bei 4 °C gelagert, um die Probenentnahme zu erleichtern, da alle Festbestandteile absinken. Des Weiteren wurde eine Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} - 10^{-6} (inkubierten Proben) bzw. 10^{-1} - 10^{-3} (nicht-inkubierte Proben) wurden auf Baird-Parker- Agar (BPA) ausplattiert. Nach 48 h bei 37 °C wurde die Keimzahl bestimmt. Die Aus-

zählung der BPA-Platten erfolgt in Anlehnung an die amtliche Methode L 00.00-55 nach dem § 64 LFGB (DIN EN ISO 6888-1).

Toxinextraktion aus Fleischprodukten

Präparation der Probe

Die zu untersuchenden Proben wurden vor der Verarbeitung mit der Hand von außen durchgemischt. Dadurch wurden die heterogen verteilten Toxine homogenisiert. Anschließend wurden 25 ± 2 g der Probe abgewogen und zur weiteren Verarbeitung in ein Becherglas überführt.

Toxinextraktionsschritt

Zur abgewogenen Probe wurden 40 ml warmes, destilliertes Wasser (38 ± 2 °C) hinzugefügt und mit dem Ultra-Turrax zerkleinert bis eine homogene Mischung entstand. Damit die Toxine aus dem Hackfleisch-Bakterien-Gemisch diffundieren können, wurde dieses für ca. 30 min bei Raumtemperatur auf einen Thermo-Magnetrührer gestellt. Anschließend wurde die zu testende Probe mit 1 n oder 2 n NaOH auf $\text{pH } 7,3 \pm 0,3$ neutralisiert, um die Proteine stabil zu halten. Danach wurde das Gemisch in ein Falcon-Tube abgefüllt und bei 3130 g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Nach Entfernen der Fettbestandteile wurde die wässrige Phase abgenommen und in einem Becherglas bei Raumtemperatur zwischengelagert.

Dialyseschritt zur Aufkonzentrierung der extrahierten Toxine

Vorbereitend für den Dialyseschritt wurde pro Probenansatz eine Dialysemembran auf eine Länge von 50 cm bis 60 cm zugeschnitten und für mindestens 30 min in destilliertem Wasser gequollen. Für jede Probe wurde eine 30%ige PEG-Lösung (Polyethylenglykol 20000, Roth, Karlsruhe, Deutschland) hergestellt. Die mittlerweile gequollenen Dialysemembranen wurden von innen und außen mit Aqua dest. gespült und an einem Ende mit einer Schnippklammer verschlossen. Das zuvor gewonnene Extrakt (die wässrige Phase aus dem vorhergehenden Arbeitsschritt) wurde über einen Glastrichter, der mit einem kleinen Stück Glaswolle versehen ist, in den Dialyseschlauch gegossen. Dieser wurde nun am anderen Ende ebenfalls verschlossen. Die Glaswolle, diente dazu, eventuelle Fettrückstände im Extrakt aufzufangen. Das gelöste PEG wurde in eine flache Fotowanne gefüllt und der verschlossene Dialyseschlauch hinein gelegt und über Nacht bei 4 °C konzentriert. Die Konzentration erfolgt über die selektive Extraktion des Wassers aus dem Dialyseschlauch durch das PEG.

Toxinrückgewinnung aus dem Dialyseschlauch

Der Dialyseschlauch wurde aus dem 30 %igen PEG entnommen und gründlich mit Aqua dest. von außen abgespült. Eine Schnippklammer wurde entfernt und in den Dialyseschlauch wurde töpfchenweise Aqua bidest. zugegeben. Zwischen den Händen wurde der Dialyseschlauch von außen hoch und runter gestrichen, um sicherzustellen, dass alle Proteine nach der Reinigung zurück gewonnen wurden. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt bis das Konzentrat ein Gewicht von $5 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$ aufwies (mittels Waage kontrolliert). Die Toxindetektion erfolgte mittels des Kits VIDAS® Staph enterotoxin II (Set 2) (bioMérieux, Lyon, Frankreich) und dem automatisierten VIDAS-Gerät (miniVIDAS, bioMérieux, Lyon, Frankreich) nach Herstellerangaben.

4. Ergebnisse

4.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1.1 Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) aus Lebensmitteln

1) Etablierung eines MPN-Verfahrens für die Zählung von niedrigen Keimzahlen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Lebensmitteln. Sie wurde in Anlehnung an die etablierte und standardisierte Methode der Amtlichen Sammlung nach §64 LFGB für das „horizontale Verfahren für die Zählung von Koagulase positiven Staphylokokken in Lebensmitteln“ (L 00.100) entwickelt.

Begriff

Die „Most Probable Number“-Methode (MPN) stellt ein Verdünnungsverfahren zur Bestimmung der Keimzahl in einer Probe dar. In Abhängigkeit der Probenverdünnung ergeben sich aus dem Wachsen oder Nicht-Wachsen der Bakterien in einer Reihe von Verdünnungskulturen statistisch begründete Schätzwerte für die Lebendkeimzahl. Anhand der Verdünnungsschritte, die erforderlich sind, um eine negative (keimfreie) Verdünnung herzustellen, lassen sich Rückschlüsse auf die Anzahl der „Kolonie-bildenden Einheiten“ (KBE) in der Probe ziehen. Die Methode eignet sich insbesondere für die Bestimmung niedriger Keimzahlen.

Verwendete Medien

- Verdünnungsflüssigkeit: Peptonwasser
- Anreicherungsmedium: Müller-Hinton-Bouillon (MHB) + 6% NaCl
- Selektivnährböden: z. B. CHROMagar MRSA von Mast Diagnostica, Brilliance MRSA Agar von Oxoid, chromID MRSA von Biomérieux, MRSA Select von Biorad
→ wobei sich die Nährböden von Mast und Biomérieux am besten eignen, da sie durchsichtig sind und ebenfalls die Identifizierung von positiven Kolonien durch deutliche Farbunterschiede zwischen positiven und negativen Kolonien erleichtern

Durchführung

Einwaage und Erstverdünnung

25 g Lebensmittel bzw. 25 ml bei flüssigen Produkten werden in Stomacherbeuteln eingewogen und mit 225 ml Peptonwasser aufgegossen. Bei abweichenden Probenmengen wird deren neunfache Menge an Verdünnungsflüssigkeit hinzugegeben. Anschließend wird die Erstverdünnung 1 min im Stomacher homogenisiert.

Herstellung der Verdünnungsreihe und Vorbereitung der Anreicherungsröhrchen

Aus der Erstverdünnung werden die Verdünnungsstufen (z. B. 10^{-1} bis 10^{-4}) in Peptonwasser hergestellt. Es werden pro Verdünnungsstufe drei (oder fünf) Anreicherungsröhrchen mit 9 ml Müller-Hinton-Bouillon (MHB) plus 6% NaCl befüllt. Werden niedrige Keimzahlen erwartet, kann die Erstverdünnung ebenfalls zum Animpfen verwendet werden. Es sollte eine ausreichende Anzahl an Verdünnungen hergestellt werden, um sicherzustellen, dass in der letzten Verdünnung drei negative Röhrchen erhalten werden.

Beimpfen der Anreicherungsröhrchen und Anreicherung

Pro Verdünnungsstufe werden drei (oder fünf) Anreicherungsröhrchen mit je 1 ml der jeweiligen Verdünnung angeimpft und für 48 h bei 37°C inkubiert.

Ausstrich auf Selektivmedium

Nach der Inkubation wird von jedem Röhrchen im Doppelansatz eine Impföse auf einen MRSA-Selektivagar ausgestrichen. Die Platte wird dafür in drei gleich große Segmente unterteilt, so dass auf eine Platte alle drei Röhrchen einer Verdünnungsstufe ausgestrichen werden kann. Aufgrund ihres durchsichtigen Agars eignen sich dafür besonders „CHROMagar MRSA“-Platten von Mast Diagnostica sowie „chromID MRSA“-Platten von Biomérieux. Sie gewährleisten ebenfalls eine zuverlässige Hemmung des Wachstums kompetitiver Begleitflora aus dem Lebensmittel. Beim Ausstrich sollte darauf geachtet werden, dass Einzelkolonien erhalten werden. Die Platten werden für 24 h bei 37°C inkubiert.

Identifizierung positiver Kolonien und Bestätigung

Je nach eingesetzter Selektivplatte zeigen positive Kolonien eine charakteristische Färbung und Koloniemorphologie. Eine angemessene Anzahl dieser Kolonien sollte weiterer Bestätigungstests unterzogen werden, wie z. B. dem Koagulase-Test oder einer Überprüfung mittels PCR.

Auswertung

Jedes Röhrchen, aus dem mindestens eine positive MRSA-Kolonie auf der Selektivplatte isoliert wurde, gilt als positiv.

Zur Ermittlung des MPN-Index wird die Verdünnungsstufe gewählt, bei der gerade noch alle drei Röhrchen positiv bewertet wurden sowie die beiden nachfolgenden Verdünnungsstufen. Anhand der daraus resultierenden dreistelligen Ziffer kann das Ergebnis (KBE pro g bzw. ml Probe) in einer MPN-Tabelle abgelesen werden. Alternativ kann ein Online-MPN-Rechner verwendet werden (<http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>).

Getestete Parameter

Erstverdünnung

Als Probenmenge wurden -falls möglich- 25 g bzw. ml Lebensmittel eingesetzt. Getestet wurde die Quantifizierung mittels MPN-Methode aus drei verschiedenen Lebensmittelmatrices: Hackfleisch, Rohmilch und Frischkäse (aus dem Handel). Nach Zugabe der Verdünnungsflüssigkeit wurde für 1 min im Stomacher homogenisiert, was zu einer ausreichenden Vermischung und Zerkleinerung führte

Anreicherungsmedien

Die Methode der Amtlichen Sammlung nach §64 LFGB für das „horizontale Verfahren für die Zählung von Koagulase positiven Staphylokokken in Lebensmitteln“ verwendet Kaliumtellurithaltiges Medium. Dieses zeigt die Anwesenheit von Koagulase positiven *S. aureus* durch die Reduktion von Kaliumtellurit und die daraus resultierende Schwarzfärbung des Mediums an. Vorteil des Mediums ist eine Vorselektion bei der Auswahl der Anreicherungsröhrchen, denn es brauchen nur noch die schwarz verfärbten Röhrchen auf Selektivplatten ausgestrichen werden. Nachteilig ist die komplizierte Handhabung des Mediums. Es muss vor Gebrauch entlüftet werden, beim Animpfen der Röhrchen darf keine Luft in das Medium eingebracht werden und anschließend muss jedes Röhrchen vorsichtig mit Agar überschichtet werden, um es luftdicht abzuschließen.

Um ein für die Routinediagnostik besser geeignetes Anreicherungsmedium für die MPN-Methode zu finden, wurden verschiedene Medien mit erhöhtem Salzgehalt getestet. *S. aureus* ist halotolerant und kann in salzhaltigen Medien wachsen, während die kompetitive Begleitflora aus den untersuchten Lebensmittelmatrices im Wachstum gehemmt wird. Getestet wurde MHB + 5% NaCl, MHB + 6% NaCl, MHB + 6,5% NaCl, TSB (trypticase soy broth) + 6% NaCl und BHI (brain heart infusion) + 6% NaCl. Dabei hat sich eine Salzkonzentration von 6% als ausreichend für die Verdrängung der Begleitflora erwiesen. Das beste Wachstum konnte in MHB beobachtet werden, so dass spätere Versuche nur noch mit MHB + 6% NaCl durchgeführt wurden.

Um die Wiederfindungsrate von subletal gestressten Zellen, die einem weiteren Stressfaktor, wie z. B. erhöhter Salzkonzentration, ausgesetzt sind, zu erhöhen, wird der Zusatz von 1% Natriumpyruvat empfohlen. Durch den doppelten Stress ist die Aktivität der Katalase vermindert, die für den Abbau von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verantwortlich ist. Dadurch akkumuliert H_2O_2 in den Zellen und führt zu einer geringeren Wiederbelebung oder Zelltod. Es wird

angenommen, dass Natriumpyruvat zum Abbau von H_2O_2 beiträgt und somit zu einem verbesserten Wachstum führt.

Dieser Effekt konnte jedoch nicht in den durchgeführten Versuchen bestätigt werden, so dass auf einen Zusatz von Natriumpyruvat verzichtet wurde.

Inkubationszeit

Durch Versuche konnte gezeigt werden, dass erst nach einer Inkubation der MPN-Röhrchen von 48 h bei 37°C ausreichend Röhrchen bewachsen waren im Gegensatz zu einer Inkubationsdauer von nur 24 h. Daher wurde eine Inkubationsdauer von 48 h gewählt, was sich mit Angaben in der Literatur deckt.

Bei der Inkubationszeit der Selektivplatten haben sich 24 h als ausreichend gezeigt. Eine verlängerte Bebrütung der Platten führte zu keinem veränderten Ergebnis im Vergleich zu einer Inkubation von 24 h.

Selektivplatten

Es wurden Selektivnährböden von Mast Diagnostica (CHROMagar MRSA), von Oxoid (Brilliance MRSA Agar), von Biomérieux (chromID MRSA) sowie von Biorad (MRSA Select) getestet. Die Nährböden von Oxoid und Biorad sind nicht durchsichtig, was den Ausstrich innerhalb der Segmente erschwert. Außerdem sind MRSA-Kolonien von anderen Kolonien z. T. nur schlecht zu unterscheiden oder das Wachstum der Begleitflora wurde nur schlecht gehemmt. Die Nährböden von Mast und Biomérieux hingegen gewährleisteten eine gute Unterdrückung der Begleitflora sowohl aus Hackfleisch als auch aus Milchprodukten und eine leichte Identifizierung der MRSA-Kolonien.

Nachweisgrenze

Mit der entwickelten MPN-Methode zum quantitativen Nachweis von MRSA in Hackfleisch, Rohmilch und Frischkäse lässt sich eine untere Nachweisgrenze von 5-10 KBE / g erreichen. Die Ergebnisse der einzelnen Ansätze sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Durchgeführte MPN-Versuchsreihen

1) Quantifizierung von MRSA in Hackfleisch

Stamm	Isolat aus:	Anreicherungsmedium	Keimlevel	MPN-Index	Verdünnungs-faktor	MPN / g	95% Konfi-denzintervall	Anmerkung	
13661	Referenzstamm	MHB + 5% NaCl	10	2-0-0	10	9,2	2,3-37	Inkubation der MPN-Röhrchen: 24h	
			100	3-2-0	10	93	23-380		
			1000	3-2-1	10 ²	1500	420-5400		
		MHB + 6% NaCl	10	3-2-0	10	93	23-380		
			100	3-1-0	10	43	10-180		
			1000	3-1-0	10 ²	430	100-1800		
		MHB + 6,5% NaCl	10	3-0-1	10	38	9,7-150		
			100	3-2-0	10	93	23-380		
			1000	3-1-0	10 ²	430	100-1800		
13661	Referenzstamm	TSB + 6% NaCl	1	0-0-0		<3		Inkubation der MPN-Röhrchen: 48h	
			10	2-0-0	10	9,2	2,3-37		
			100	3-0-0	10 ²	240	67-860		
		TSB + 1% Na-pyruvat	1	1-0-0	10	3,6	0,51-25		anderes Keim-level zum Spi-ken verwendet
			10	3-0-0	10	23	6,6-81		
			100	3-2-0	10	93	23-380		
		TSB + 6% NaCl + 1% Na-pyruvat	1	0-0-0	10	<3			
			10	1-0-0	10	3,6	0,51-25		
			100	3-1-0	10	43	10-180		
08S0-915	Hackfleisch / Schwein	TSB + 6 % NaCl	10	0-0-0		<3		Inkubation der MPN-Röhrchen: 48h	
			100	3-1-0	10	43	10-180		
			1000	3-0-0	10 ²	230	6,6-810		
		MHB + 6 % NaCl	10	3-0-0	10	23	6,6-81		
			100	3-0-0	10	230	66-810		
			1000	3-0-0	10 ²	2300	660-8100		
		BHI + 6 % NaCl	10	1-0-0	10	3,6	0,51-25		
			100	3-1-0	10	43	10-180		
			1000	3-0-0	10 ²	2300	660-8100		

Stamm	Isolat aus:	Anreicherungsmedium	Keimlevel	MPN-Index	Verdünnungsfaktor	MPN / g	95% Konfidenzintervall	Anmerkung
08SO-911	Mischhack	MHB + 6% NaCl	10	3-0-0	10	23	6,6-81	Inkubation der MPN-Röhrchen: 48h
			100	3-0-0	10 ²	230	66-810	
			1000	3-2-1	10 ²	1500	420-5400	
		MHB + 6,5% NaCl	10	2-0-0	10	9,2	2,3-37	
			100	3-0-0	10 ²	230	66-810	
			1000	3-2-0	10 ²	930	230-3800	
13661	Referenzstamm	MHB + 6% NaCl	10	1-0-0	10	3,6	0,51-25	Inkubation der MPN-Röhrchen: 48h
			100	3-2-0	10	93	23-380	
			1000	3-2-0	10 ²	930	230-3800	
08SO-911	Mischhack	MHB + 6% NaCl	10	0-0-0	10	<3		Inkubation der MPN-Röhrchen: 48h
			100	3-2-1	10	150	42-540	
			1000	3-0-0	10 ²	2300	660-8100	
08SO-915	Hackfleisch / Schwein	MHB + 6% NaCl	10	0-0-1	10	3	0,37-25	Inkubation der MPN-Röhrchen: 48h
			100	3-1-0	10	43	10-180	
			1000	3-2-0	10 ²	930	230-3800	
09SO-631	Schweinehals	MHB + 6% NaCl	10	1-0-0	10	3,6	0,51-25	Inkubation der MPN-Röhrchen: 48h
			100	3-1-0	10	43	10-180	
			1000	3-0-1	10 ²	380	97-1500	
09SO-633	Schweinerücken gewürzt	MHB + 6% NaCl	10	1-1-0	10	7,4	1,7-33	Inkubation der MPN-Röhrchen: 48h
			100	3-0-0	10	23	6,6-81	
			1000	3-1-0	10 ²	430	100-1800	
09SO-1165	Schweinehackfleisch	MHB + 6% NaCl	10	0-0-0	10	<3		Inkubation der MPN-Röhrchen: 48h
			100	3-0-0	10	23	6,6-81	
			1000	3-2-0	10 ²	930	230-3800	

2) Quantifizierung von MRSA in Milch

Stamm	Isolat aus:	Anreicherungs- medium	Keim- level	MPN- Index	Verdün- nungsfaktor	MPN / ml	95% Konfi- denzintervall	Anmerkung
09S0-1066	Liefermilch	MHB + 6% NaCl	10	3-0-0	10	23	6,6-81	Inkubation der MPN- Röhrchen: 48h
			100	3-2-1	10	150	42-540	
			1000	3-2-1	10 ²	1500	420-5400	
		MHB + 6,5% NaCl	10	2-1-0	10	15	4,1-52	
			100	3-2-0	10 ²	930	230-3800	
			1000	3-3-0	10 ²	2400	670-8600	
09S0-631	Schweinehals	MHB + 6% NaCl	10	1-1-0	10	7,4	1,7-33	Inkubation der MPN- Röhrchen: 48h
			100	3-1-0	10	43	10-180	
			1000	3-3-1	10 ²	4600	1000-21000	
09S0-1088	Liefermilch	MHB + 6% NaCl	10	1-1-0	10	7,4	1,7-33	Inkubation der MPN- Röhrchen: 48h
			100	3-2-0	10	93	23-380	
			1000	3-2-0	10 ²	930	230-3800	
13661	Referenz- stamm	MHB + 6% NaCl	10	1-1-0	10	7,4	1,7-33	Inkubation der MPN- Röhrchen: 48h
			100	3-2-0	10	93	23-380	
			1000	3-2-0	10 ²	930	230-3800	
09S0-160 (Tankmilch- probe)		MHB + 6% NaCl	Feldprobe	3-0-0	10	23	6,6-81	Inkubation der MPN- Röhrchen: 48h
			Keimlevel unbe- kannt					
09S0-161 (Tankmilch- probe)		MHB + 6% NaCl	Feldprobe	3-0-0	10 ²	230	66-810	Inkubation der MPN- Röhrchen: 48h
			Keimlevel unbe- kannt					
09S0-162 (Tankmilch- probe)		MHB + 6% NaCl	Feldprobe	1-0-0	10	3,6	0,51-25	Inkubation der MPN- Röhrchen: 48h
			Keimlevel unbe- kannt					

3) Quantifizierung von MRSA in Frischkäse

Stamm	Isolat aus:	Anreicherungs- medium	Keim- level	MPN- Index	Verdünnungs- faktor	MPN / ml	95% Konfi- denzintervall	Anmerkung
09S0-533	Hähnchenbrustfilet	MHB + 6% NaCl	10	2-0-0	10	9,2	2,3-37	20 g Frischkäse; Inkubation der MPN- Röhrchen: 48h
			100	3-2-1	10	150	42-540	
			1000	3-2-0	10 ²	930	230-3800	
		MHB + 6,5% NaCl	10	1-0-0	10	3,6	0,51-25	
			100	3-2-0	10	93	23-380	
			1000	3-2-0	10 ²	930	230-3800	
09S0-629	Roh-/Tankmilch	MHB + 6% NaCl	10	1-0-0	10	3,6	0,51-25	20 g körniger Frischkäse; Inkubation der MPN- Röhrchen: 48h
			100	3-1-0	10	43	10-180	
			1000	3-3-1	10 ²	4600	1000-21000	
		MHB + 6,5% NaCl	10	1-0-0	10	3,6	0,51-25	
			100	3-0-0	10 ²	230	66-810	
			1000	3-1-0	10 ²	430	100-1800	
09S0-650	Viertelgemelk	MHB + 6% NaCl	10	1-1-0	10	7,4	1,7-33	20 g körniger Frischkäse; Inkubation der MPN- Röhrchen: 48h
			100	3-1-2	10	120	30-440	
			1000	3-2-0	10 ²	930	230-3800	
		MHB + 6,5% NaCl	10	1-1-0	10	7,4	1,7-33	
			100	3-2-3	10	290	78-1100	
			1000	3-2-0	10 ²	930	230-3800	
247	Ringversuch	MHB + 6,5% NaCl		3-0-0	10 ³	2,3 x 10 ³	660-8100	48h
248	Ringversuch	MHB + 6,5% NaCl		3-3-1	10 ³	4,6 x 10 ⁴	10000-210000	48h
249	Ringversuch	MHB + 6,5% NaCl		3-1-0	10 ²	4,3 x 10 ²	100-1800	48h
250	Ringversuch	MHB + 6,5% NaCl		0-0-0	10	<3		48h
251	Ringversuch	MHB + 6,5% NaCl		3-2-1	10 ³	1,5 x 10 ⁴	4200-541000	48h
252	Ringversuch	MHB + 6,5% NaCl		3-2-0	10 ²	9,3 x 10 ²	230-3800	48h
253	Ringversuch	MHB + 6,5% NaCl		3-0-0	10 ³	2,3 x 10 ³	660-8100	48h

2) Etablierung einer Real-time PCR zur Quantifizierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* aus Lebensmitteln

Ziel war es eine quantitative Nachweismethode von MRSA mittels Real-Time PCR für die Routinediagnostik zu entwickeln.

Identifizierung eines MRSA-spezifischen Sequenzbereiches

Eine Grundvoraussetzung für die Etablierung der Methode war es, einen Sequenzbereich zu identifizieren, der spezifisch für MRSA ist. Bereits etablierte Real-Time Systeme für *S. aureus* können nicht genutzt werden, da die zugrunde liegenden Sequenzbereiche zwar spezifisch für *S. aureus* sind, jedoch nicht für Methicillin-resistente *S. aureus*. Demzufolge muss ein Bereich gefunden werden, der die Methicillinresistenz mit erfasst. Viele in der Literatur beschriebene Real-Time Ansätze für die Identifizierung von MRSA basieren auf der Detektion des *mecA* Gens, welches für die Methicillinresistenz verantwortlich ist. Dieses Gen ist jedoch nicht nur in *S. aureus* zu finden und eignet sich daher nicht als Target für die Quantifizierung von MRSA, weil auch andere Methicillin-resistente Erreger erfasst werden würden.

Auch eine Multiplex-Real-Time PCR, die sowohl das *mecA* Gen als auch ein *S. aureus* spezifisches Gen (z. B. *nuc*) detektiert, eignet sich nicht. Es ist nicht gewährleistet, dass bei Nachweis der beiden Gene, diese auch in einem gemeinsamen Genom liegen. Da bei der DNA-Isolierung sämtliche im Lebensmittel vorhandenen Keime isoliert werden, ist es durchaus möglich, das bei einer anschließenden Real-Time PCR z. B. ein positives Signal für das *nuc* Gen von einem MSSA stammt und das Signal für das *mecA* Gen von einem Methicillin-resistenten *Streptococcus*.

Huletsky et al. beschreiben eine Real-Time PCR, deren Target sich im Übergangsbereich zwischen der Integrationsstelle im *S. aureus* Genom (*orfX*) und der *SCCmec*-Kassette befindet (Huletsky et al. 2004). Der forward Primer bindet innerhalb des *S. aureus* spezifischen *orfX* und der backward Primer im angrenzenden Bereich der *SCCmec*-Kassette. Somit ist gewährleistet, dass es sich um einen *S. aureus* mit integrierter *SCCmec* Kassette handelt. Die *SCCmec* Kassette enthält zwei essentielle genetische Komponenten: den *mec* Genkomplex und den *ccr* Genkomplex. Unterschiedliche Kombinationen dieser beiden Genkomplexe führen zu verschiedenen Typen von *SCCmec*-Typen. Derzeit unterscheidet man

acht verschiedene Typen, die sich zum Teil nochmals in Subtypen aufspalten. Dies bedingt ebenfalls, dass der angrenzende Sequenzbereich zum *orfX*, in denen der backward Primer lokalisiert ist, keine für alle *SCCmec* Typen konservierte Region darstellt. So haben auch Huletsky et al. für den *SCCmec* Typ III mehrere Primer entwickeln müssen, um unterschiedliche Subtypen zu erfassen.

In ersten Versuchen wurden die Primerpaare von Huletsky et al. für den *SCCmec* Typen III eingesetzt, denn dieser gehört zu den vorherrschenden Typen in der Stammsammlung des NRL sind. Es generierte doch keines der Primerpaare ein Produkt. Dies bedeutet, dass wahrscheinlich noch weitere Subtypen des *SCCmec* Typ III existieren.

Für den *SCCmec* Typ V wurden von Huletsky et al. keine Primer vorgeschlagen. Verwendet man zum Primerdesign, die in der GenBank abgelegte Sequenz für den Typ V (accession no. AB121219), generiert die anschließende PCR ebenfalls kein Produkt. Auch hier lässt sich folgern, dass verschiedene Subtypen existieren, deren Sequenz noch unbekannt ist.

Ohne neue Sequenzdaten, ist es also nicht möglich eine Real-Time PCR für die vorherrschenden *SCCmec* Typen der Stammsammlung des NRL zu entwickeln.

Daher wurden die Sequenzierprimer von Huletsky et al. verwendet. Der forward Primer bindet wieder innerhalb des *orfX* während der backward Primer im Insertionselement IS431 lokalisiert ist. Dieses Insertionselement ist im Chromosom aller Methicillin-resistenten *S. aureus* enthalten, jedoch nicht immer an der gleichen Stelle, so dass PCR-Produkte unterschiedlicher Größe generiert werden oder auch gar keines, wenn das Insertionselement zu weit entfernt vom *orfX* inseriert ist. Die durchgeführte PCR ergab zwar Produkte, die jedoch keine Sequenzübereinstimmungen mit dem *orfX* oder dem Insertionselement aufwiesen, so dass es sich um unspezifische Banden handelt.

Für die Generierung von verlässlichen Sequenzdaten müsste zuvor eine Genbank, z.B. eine Cosmid-Genbank angelegt werden. Dies ist ein aufwendiges Verfahren, zumal nicht bekannt ist, wie viele Subtypen eines *SCCmec* Typen erwartet werden können. Es ist anzunehmen, dass Primer basierend auf einer neuen Sequenz z. B. der Typ V Kasette immer noch nicht alle Stämme dieses *mec* Typen detektieren können. Es müssten also Genbanken von meh-

renen Stämmen angelegt werden, was kosten- und zeitaufwendig ist und daher nicht im Rahmen des Projektes durchgeführt werden konnte.

3) Vergleich verschiedener Probenahmeverfahren zur Beprobung von Schlachtkörperoberflächen (Schwein) auf MRSA

Vor der experimentellen Kontamination wurden keine MRSA auf den Schlachtkörpern nachgewiesen. Die ermittelten Keimzahlen auf den Schlachtkörperoberflächen differierten zwischen den drei angewandten Methoden (Tabelle 4). Nach Kontamination mit der geringeren Erregerkonzentration konnten in 8 von 10 Proben mit dem Nass-Trocken-Tupfer (NTT) keine MRSA nachgewiesen werden. Auch mit der Stanze wurden in 5 der 10 Proben keine MRSA nachgewiesen. Mit der Kratzschwamm-Methode konnte in jeder der 10 Proben MRSA nachgewiesen werden. Die ermittelten Keimzahlen waren mit der Kratzschwamm-Methode am höchsten (bis zu $2,9 \times 10^2$ KbE / ml). In den fünf Proben, die mit der Stanze gewonnen worden waren, die ein Messergebnis aufwiesen waren die ermittelten Keimgehalte / cm^2 ähnlich hoch, wie mit der Kratzschwamm-Methode.

Die Proben von den Oberflächen, die mit der höheren Erregerkonzentration (107 KbE/ml) kontaminiert worden waren, waren mit allen Methoden auswertbar. Hier wurden die höchsten Keimgehalte mit der Stanze ermittelt (bis zu $6,7 \times 10^4$ KbE/ cm^2), gefolgt von der Kratzschwamm-Methode (bis $2,4 \times 10^4$ KbE/ cm^2) und dem Nass-Trocken-Tupfer (bis $1,7 \times 10^3$ KbE/ cm^2). Der Variationskoeffizient für die Ergebnisse der 10 Messungen war am niedrigsten für die Kratzschwamm-Methode (0,08) gefolgt von der Stanze (0,11) und dem Nass-Trocken-Tupfer (0,22).

Tabelle 4: Keimzahlen von MRSA (KbE/cm²) auf Schlachtkörperoberflächen, die mit zwei verschiedenen Keimsuspensionen (10⁵ bzw. 10⁷ KbE/ml) kontaminiert wurden, unter Verwendung dreier verschiedener Probenahmeverfahren.

Entnahmeverfahren	Nass-Trocken-Tupfer		Kratzschwamm		Stanze	
	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁷
Probenfeld 1	1,0*10 ¹	3,2*10 ²	4,0*10 ¹	2,2*10 ⁴	<10	1,8*10 ⁴
Probenfeld 2	<10	1,1*10 ²	1,6*10 ²	1,5*10 ⁴	2,4*10 ²	2,7*10 ⁴
Probenfeld 3	<10	2,0*10 ²	1,2*10 ²	2,0*10 ⁴	<10	3,0*10 ⁴
Probenfeld 4	<10	5,0*10 ¹	2,7*10 ²	6,5*10 ³	2,5*10 ²	2,3*10 ⁴
Probenfeld 5	<10	5,0*10 ¹	8,1*10 ¹	2,0*10 ³	2,0*10 ²	2,8*10 ³
Probenfeld 6	<10	6,6*10 ²	2,7*10 ¹	1,7*10 ⁴	1,9*10 ²	2,7*10 ⁴
Probenfeld 7	<10	6,5*10 ²	2,7*10 ¹	2,4*10 ⁴	<10	5,1*10 ⁴
Probenfeld 8	<10	1,3*10 ³	3,0*10 ²	2,0*10 ⁴	<10	4,1*10 ⁴
Probenfeld 9	<10	1,7*10 ³	6,0*10 ¹	1,0*10 ⁴	1,4*10 ²	3,1*10 ⁴
Probenfeld 10	1,0*10 ¹	7,7*10 ²	9,0*10 ¹	9,5*10 ³	<10	6,7*10 ⁴
Geometrisches Mittel	0,5*10 ¹	3,2*10 ²	8,5*10 ¹	1,2*10 ⁴	3,1*10 ¹	2,5*10 ⁴
Variationskoeffizient		0,22		0,08		0,11

*Keimgehalt der zur Kontamination verwendeten Suspension in KbE / ml

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass bei geringer Keimbelastung – und davon ist nach derzeitigem Wissensstand auszugehen – das Nass-Trocken-Tupfer-Verfahren ungeeignet ist, MRSA auf Schlachtkörpern zu quantifizieren. Auch die Probennahme mit der Stanze erweist sich hier als unzuverlässig. Ursache ist dafür möglicherweise die im Vergleich zur Kratzschwammethode geringere beprobte Fläche, die es möglich macht, dass regionale Unterschiede in der Kontamination im ungünstigen Fall zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Die besten Ergebnisse wurden bei geringer Kontamination mit der Kratzschwammethode erzielt.

Bei stärker kontaminierten Oberflächen ergab die Untersuchung mit der Stanze die höchsten Keimzahlen. Durch das Einbringen des kompletten Hautabschnitts in die Untersuchung las-

sen sich die vorhandenen Keime fast vollständig nachweisen. Mit der Kratzschwamm-
methode lassen sich Ergebnisse erzielen, die dieser Methode sehr nahe kommen, während der
Nass-Trocken-Tupfer deutlich geringere Keimzahlen erzielt. Ein Vorteil der Kratzschwamm-
methode ist, dass sie nicht destruktiv ist, und damit wiederholte Untersuchungen desselben
Schlachtkörpers im Rahmen der Prozesskontrolle ermöglicht.

4) Exemplarische Untersuchungen zum Wachstum und zur Toxinbildung von MRSA in Hackfleisch

Die exemplarischen Untersuchungen zum Wachstum von MRSA in Lebensmitteln zeigten,
dass MRSA sich in Hackfleisch vermehren können und bei Vorhandensein von Enterotoxin-
genen auch Toxine bilden (Tabelle 5). Insgesamt war das Wachstum im Vergleich zu dem
parallel inkubierten MSSA nur geringfügig vermindert. Die Bedeutung dieses Unterschieds
ist aber noch nicht zu bewerten. Die etwas schwächere Reaktion beim Toxinnachweis
stimmt mit diesem geringeren Keimwachstum überein (Abbildung 2).

Tabelle 5: Wachstum von MRSA und MSSA in experimentell mit 10^3 KbE/g kontaminiertem
gemischtem Hack innerhalb von 24 Stunden bei 37 °C, sowie die beobachtete
Bildung von Enterotoxinen

	MRSA (t032, ST22)	MSSA
Stammbezeichnung	08S00911	09S00635
Herkunft	Gemischtes Hackfleisch (Rind/Schwein)	Ziegenweichkäse (Rohmilchkäse)
Toxigen-Nachweis mittels PCR*	seg, sec, sei	sec
Eingesetztes Keimlevel / g Hackfleisch	10^3 KbE/g	10^3 KbE/g
Inkubations-Zeit/Temperatur	24h, 37 °C	24h, 37 °C
Keimgehalt (KbE / g) nach Inkubation	$5,8 \times 10^5$ KbE/ml	$4,1 \times 10^6$ KbE/ml
Toxinexprimierung	ja	ja

*Mittels des VIDAS-Tests sind nur die Staphylococcus Enterotoxine A bis E nachweisbar.

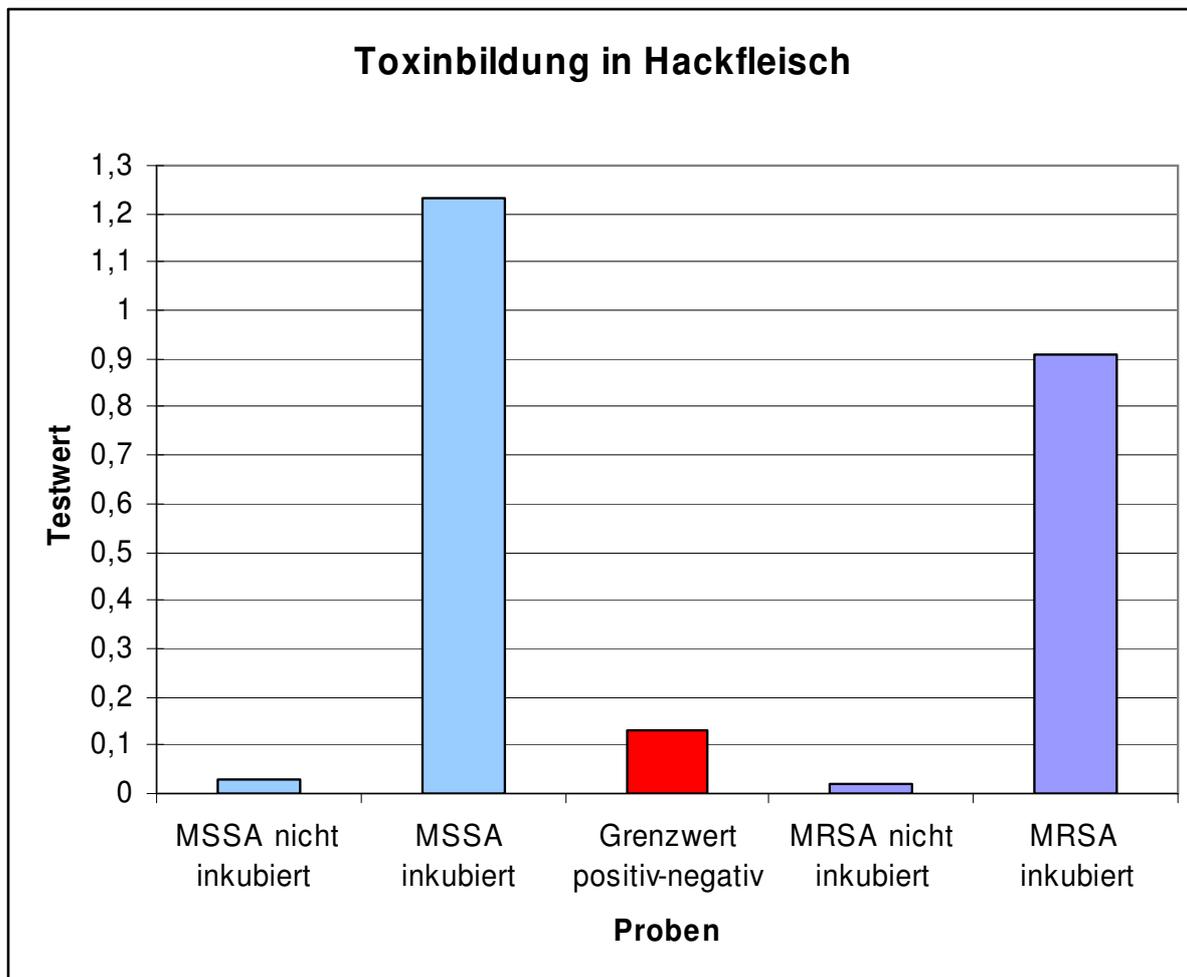


Abbildung 2: Toxinbildung von 2 Stämmen von *S. aureus* in Hackfleisch nach experimenteller Kontamination mit 10^3 KbE/g und 24 Stunden Inkubation bei 37 °C. Toxinbestimmung mit dem VIDAS-Gerät.; Testwert <0,13 = negativ d.h kein Toxin detektiert, >0,13 = positiv d.h. Toxin detektiert. Grenzwert wird vom Gerät ermittelt.

4.1.2 Optimierung und Etablierung von Methoden

1) Optimierung des selektiven qualitativen Nachweisverfahrens von MRSA

Bei der Etablierung dieser Methode wurde das derzeit angewandte Referenzverfahren für die Matrices Staub, Tupfermaterial und Lebensmittel modifiziert und für den Nachweis im Lebensmittel auch hinsichtlich des Kosten-Nutzen-Effektes optimiert.

Kurzbeschreibung:

Die Probe wird in einem elektromechanischen Mischgerät (Stomacher) mit einer sterilen Verdünnungslösung (entfällt bei flüssigen Proben) homogenisiert (Erstverdünnung). Danach erfolgt die Beimpfung des Voranreicherungsmediums mit der Erstverdünnung im Verhältnis 1:10. Das beimpfte Voranreicherungsmedium wird 18-24 h bei $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ bebrütet. Anschließend wird ein MRSA-Selektivnährmedium mit dem bebrüteten Voranreicherungsmedium im Verhältnis 1:10 beimpft und 18-24 h bei $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Von dem bebrüteten Selektivmedium werden zwei Platten eines MRSA-Selektivnährbodens beimpft (die Beimpfung von zwei Platten erhöht die Wiederfindungswahrscheinlichkeit). Weist das Röhrchen nach der Inkubation eine Trübung auf, so werden Dezimalverdünnungen hergestellt. Von der gewählten Dezimalverdünnung werden 2 Platten eines MRSA-Selektivagars beimpft. Die Selektivplatten werden nach Herstellerangaben bebrütet und ausgewertet.

Verdünnungsflüssigkeit und Nährmedien:

Erstverdünnung:

Peptonwasser 1%, gepuffert (PW 1)

Dezimalverdünnungen:

NaCl –Lösung, physiologisch

Voranreicherungsmedium:

Müller-Hinton-Bouillon (MHB) + 6% NaCl

(MHB auch kommerziell erhältlich)

Selektivnährmedium:

Caso-Lösung (CasoL) + 3,5 mg/l Cefoxitin und + 50 mg/l Aztreonam
(CasoL auch kommerziell erhältlich)

Selektivnährböden: *

z.B. CHROMagar MRSA von Mast Diagnostica,
chromID MRSA von bioMérieux,
Brilliance MRSA Agar von Oxoid,
MRSA-Ident von Heipha

* Hinweis zur Auswahl des Selektivagars:

Alle chromogenen Nährböden wurden einer quantitativen Vergleichsstudie unterzogen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt; lediglich die Keimzahl ließ sich bei den transparenten Nährböden von der Hersteller Mast Diagnostica und bioMérieux leichter ermitteln

Durchführung:

Einwaage und Erstverdünnung

25 g Lebensmittel (25 ml bei Flüssigkeiten) werden in einen sterilen Stomacherbeutel eingewogen. Zu der Untersuchungsprobe wird die neunfache Menge (225 ml) Verdünnungsflüssigkeit (1.1) gegeben und im Stomacher homogenisiert. Bei flüssigen Proben ist eine Zugabe von Verdünnungsflüssigkeit nicht notwendig; die Probe ist nur zu homogenisieren. Die Temperatur der Verdünnungslösung sollte bei Zugabe nicht unter 10°C liegen.

Beimpfung des Voranreicherungsmediums

Unmittelbar nach der Herstellung werden der homogenisierten Erstverdünnung bzw. flüssigen Probe 1 ml entnommen und zu 9 ml Voranreicherungsmedium in ein Kulturröhrchen gegeben und durch vorsichtiges Vortexen oder Auf- und Abpipettieren gemischt. Das beimpfte Voranreicherungsmedium wird für 18-24 h bei 37°C ± 2°C aerob bebrütet.

Beimpfung des selektiven Nährmediums

Nach der Inkubation wird von dem bebrüteten Voranreicherungsmedium 1 ml entnommen und zu 9 ml antibiotikahaltigem Selektivnährmedium in ein Kulturröhrchen gegeben und durch vorsichtiges Vortexen oder Auf- und Abpipettieren gemischt.

Das beimpfte Selektivnährmedium wird für 18-24 h bei $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ aerob bebrütet.

Herstellung weiterer Dezimalverdünnungen

Bei sehr starker Trübung des Selektivmediums (Anzeichen für starke Keimvermehrung) ist es sinnvoll, weitere Dezimalverdünnungen herzustellen.

Hierfür wird 1 ml des bebrüteten Selektivmediums zu 9 ml NaCl-Lösung gegeben und sorgfältig gemischt, wodurch eine 10^{-1} -Verdünnung erhalten wird. Falls erforderlich, wird dieser Schritt unter Verwendung der 10^{-1} -Verdünnung und weiterer Verdünnungen wiederholt, bis die geeignete Verdünnungsstufe erreicht ist.

Beimpfung der Selektivplatten, Bebrütung und Auswertung

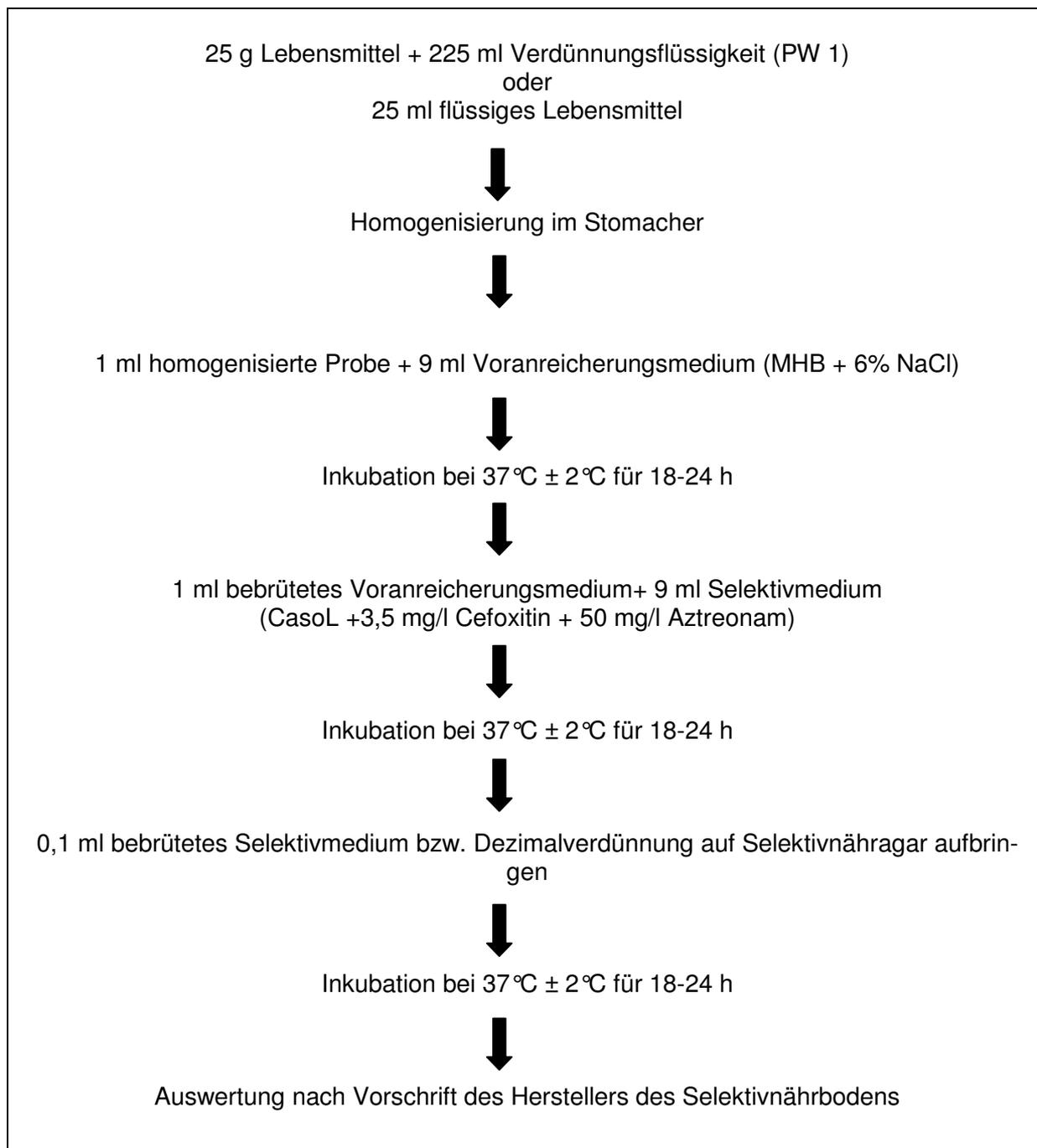
Mit einer sterilen Pipette werden zweimal 0,1 ml des bebrüteten Selektivmediums und einer Dezimalverdünnung (z.B. 10^{-2} , 10^{-3}) auf jeweils eine MRSA-Selektivplatte übertragen (Doppelansatz).

Anmerkung: Wird eine sehr geringe Keimzahl erwartet, so wird zweimal 1 ml des bebrüteten Selektivnährmediums (Doppelansatz) auf jeweils 3 Selektivplatten aufgebracht.

Die beimpften Platten werden bei $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ für 24 ± 2 h bebrütet.

Die Auswertung der chromogenen Platten erfolgt nach Angaben des Herstellers.

Abbildung 3: Fließschema für den qualitativen Nachweis von MRSA in Lebensmitteln



2) Entwicklung einer Methode zum Vergleich von MRSA-Isolaten mittels der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die DNA von zwölf MRSA-Isolaten unterschiedlicher Herkunft wurde dem Verdau mit 3 verschiedenen Restriktionsenzymen unterzogen. Unter den Isolaten waren 6 Isolate des MLST-Typs ST398, von denen 5 MRSA und einer ein MSSA waren. Daneben wurden 5 humane MRSA-Isolate anderer MLST-Typen sowie der Referenzstamm *S. aureus* NCTC8325 einbezogen.

Die DNA der humanen Stämme und des Referenzstammes konnte mit allen drei getesteten Restriktionsenzymen verdaut werden. Alle drei Enzyme lieferten für die jeweiligen Isolate identische Bandenmuster. Die DNA der ST398-Stämme konnte mit SmaI nicht, mit XmaI nur teilweise, mit cfr91 aber vollständig verdaut werden. Die sechs ST398-Stämme hatten ähnliche Bandenmuster, die sich aber doch in bis zu vier Banden unterschieden.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Resistenz der ST398-Isolate gegen SmaI durch eine C5-cytosin-methyltransferase vermittelt wird. Die etablierte Methode wurde mittlerweile publiziert (Argudin et al. 2010).

3) Erarbeitung eines international standardisierten MHK-Plattenformats

Die Untersuchung von MRSA auf Resistenz gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen erfolgt in der Praxis vorwiegend anhand der Agardiffusionsmethode und der Bouillon-Mikrodilutionsmethode. Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Mikrodilutionsmethode ist es vorteilhaft, wenn international abgestimmte Substanzen in abgestimmten Konzentrationen in die Testung einbezogen werden und wenn die Bewertung des Ergebnisses nach einem einheitlichen oder zumindest nachvollziehbaren Standard erfolgt. Zu diesem Zweck wurde seitens des Nationalen Referenzlabors für Antibiotikaresistenz ein Vorschlag für ein Plattenformat erarbeitet und internationalen Kooperationspartnern zur Kommentierung übermittelt. Das abgestimmte Plattenlayout ist in Tabelle 6 wieder gegeben. Bisher haben Vertreter von 13 EU-Mitgliedsstaaten sowie die Schweiz und Norwegen dem Layout zugestimmt.

SENSITITRE CUSTOM PLATE FORMAT

1310091710

Plate Code: EUST Date: 23. Okt 09

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	ANTIMICROBICS
A	CLI	CLI	CLI	CLI	CLI	CLI	ERY	ERY	ERY	ERY	ERY	ERY	CLI Clindamycin
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	0.25	0.5	1	2	4	8	TET Tetracycline
B	TET	TET	TET	TET	TET	TET	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	RIF Rifampin
	0.5	1	2	4	8	16	0.25	0.5	1	2	4	8	STR Streptomycin
C	RIF	RIF	RIF	RIF	RIF	RIF	FOX	FOX	FOX	FOX	FOX	FOX	FUS Fusidate
	0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	0.5	1	2	4	8	16	PEN Penicillin
D	STR	STR	STR	STR	TIA	TIA	TIA	TIA	LZD	LZD	LZD	LZD	CHL Chloramphenicol
	4	8	16	32	0.5	1	2	4	1	2	4	8	KAN Kanamycin
E	FUS	FUS	FUS	FUS	SYN	SYN	SYN	SYN	MUP	MUP	MUP	MUP	TIA Tiamulin
	0.5	1	2	4	0.5	1	2	4	0.5	1	2	256	SYN Quinupristin / dalpofristin
F	PEN	PEN	PEN	PEN	PEN	VAN	VAN	VAN	VAN	VAN	SMX	SMX	VAN Vancomycin
	0.12	0.25	0.5	1	2	1	2	4	8	16	64	128	GEN Gentamicin
G	CHL	CHL	CHL	CHL	CHL	GEN	GEN	GEN	GEN	GEN	SMX	SMX	TMP Trimethoprim
	4	8	16	32	64	1	2	4	8	16	256	512	ERY Erythromycin
H	KAN	KAN	KAN	KAN	KAN	TMP	TMP	TMP	TMP	TMP	NEG	POS	CIP Ciprofloxacin
	4	8	16	32	64	2	4	8	16	32	CON	CON	FOX Cefoxitin

NEG	Negative Control	LZD	Linezolid
POS	Positive Control	MUP	Mupirocin
		SMX	Sulfamethoxazole

Tabelle 6: Plattenformat zur Untersuchung von MRSA auf Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen

4.1.3 Ergebnisse der Antibiotikaresistenztestung, molekularen Typisierung und Charakterisierung der Isolate

1) Isolate aus Zuchtschweinebeständen

Die im Rahmen der EU-Grundlagenstudie zu MRSA in Beständen mit Zuchtschweinen (Entscheidung 2008/55/EG) gewonnenen Isolate (n=84) wurden parallel zum hier beschriebenen Projekt typisiert. Sie werden in den Bericht integriert, um vergleichend einbezogen werden zu können und weil Untersuchungen an den Isolaten durchgeführt wurden, die über die Notwendigkeiten der Analyse für die EU-Grundlagenstudie hinausgingen. Die Ergebnisse der Prävalenzerhebung wurden mittlerweile von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit veröffentlicht (EFSA 2009).

Die 84 MRSA-Isolate gehörten 10 verschiedenen *spa*-Typen an Tabelle 7. Die meisten gehörten zu den *spa*-Typen t011 (66,7 %) und t034 (14,3 %) sowie t108 (6,0 %). Diese *spa*-Typen werden in der Literatur dem MLST-Typ ST398 zugeordnet. Auch die meisten der weiteren identifizierten *spa*-Typen sind diesem MLST-Typ zuzuordnen.

Zwei Isolate waren dem *spa*-Typ t007 zuzuordnen, der dem MLST-Typ ST39 zugerechnet wird. Ein Isolat wurde dem *spa*-Typ t1430 zugeordnet. Mit diesem ist der MLST-Typ ST9 verbunden. Die zwei Isolate vom *spa*-Typ t3992 und ein Isolat vom Typ t5487 waren dem MLST-Typ ST97 zuzuordnen. Die Zugehörigkeit dieser *spa*-Typen zu den entsprechenden MLST-Typen konnte anhand der MLST-Typisierung je eines der Isolate bestätigt werden. Damit gehörten insgesamt 6 der 84 Isolate (7,1 %) nicht dem MLST-Typ ST398 an.

Die in den Isolaten nachgewiesenen *SCCmec* (Tabelle 8) waren überwiegend vom Typ V (72/84). *SCCmec* Typ III kam nur in 5 Isolaten vor, von denen 4 dem *spa*-Typ t034 zuzuordnen waren. Kassetten vom Typ II wurden in 2 Isolaten identifiziert. Diese gehörten jedoch zum *spa*-Typ t007 und dem MLST-Typ ST39. Kassetten vom Typ II werden häufig in Krankenhausstämmen von MRSA identifiziert, so dass es sich bei diesen Isolaten vermutlich um solche Stämme handelt, die über Menschen in die Schweinebestände eingetragen wurden.

Wie zu erwarten waren die Isolate überwiegend resistent gegen Oxacillin und Tetrazyklin. Bei einem cut off von ≤ 2 mg/l für Oxacillin erwiesen sich allerdings bei der Testung durch die Bouillon-Mikrodilution 17 der 81 untersuchten Isolate als phänotypisch sensibel gegen Oxacillin, obwohl sie mittels selektiver Anreicherung isoliert worden waren. Die Mehrzahl der als empfindlich klassifizierten Isolate zeigte eine minimale Hemmkonzentration von 2mg/l. Die

Ursache dieser verminderten Resistenz ist nicht klar. Ein Effekt der Lagerung der Stämme ist nicht auszuschließen.

Ansonsten zeigten die Stämme aus Zuchtschweinebeständen ähnliche Resistenzmuster wie diejenigen, die aus Schweinefleisch und Schweinefleischzubereitungen isoliert wurden (s. unter Lebensmittel) (**Abbildung 6**).

Tabelle 7: Nachweis unterschiedlicher *spa*-Typen von MRSA in Zucht- und Ferkelerzeugerbetrieben

	Zuchtbetriebe		Ferkelerzeugerbetriebe		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%
ST398	20	100	58	90,4	78	92,9
t011	15	75	41	64,1	56	66,7
t034	3	15	9	14,1	12	14,3
t108	1	5	4	6,3	5	6,0
t1250			1	1,6	1	1,2
t1451			2	3,1	2	2,4
t2510	1	5	1	1,6	2	2,4
Non-ST398	0	0	6	9,4	6	7,1
t007 (ST39)			2	3,1	2	2,4
t1430 (ST9)			1	1,6	1	1,2
t3992 (ST97)			2	3,1	2	2,4
t5487 (ST97)			1	1,6	1	1,2
Gesamt	20	100	64	100	84	100

Tabelle 8: Beziehungen zwischen *spa*-Typ und *SCCmec* – Typ bei den 84 Isolaten der Zuchtschweinstudie

<i>Spa</i> -Typ	SCC <i>mec</i> -Typ					Gesamt
	II	III	V	IVa	n.t.	
t007	2	0	0	0	0	2
t011	0	1	54	1	0	56
t034	0	4	5	0	3	11
t108	0	0	5	0	0	5
t1250	0	0	1	0	0	1
t1430	0	0	0	1	0	1
t1451	0	0	2	0	0	2
t2510	0	0	2	0	0	2
t3992	0	0	2	0	0	2
t5487	0	0	1	0	0	1
Gesamt	2	5	72	2	2	84

2) Isolate aus Mastschweinebeständen

Sämtliche Isolate (n=145) aus Staubproben aus Mastschweinebeständen gehörten dem MLST-Typ ST398 an. Es überwogen Isolate der *spa*-Typen t011 (96 Isolate, 66,2 %) und t034 (33 Isolate, 22,8 %). Neben diesen Typen wurden noch 10 andere *spa*-Typen nachgewiesen, von denen jedoch keiner mehr als 4 mal nachgewiesen wurde (Tabelle 9). In Bezug auf den Anteil der beiden dominierenden *spa*-Typen zeigten sich regionale Unterschiede. So wurden in einem Bundesland fast ausschließlich t011 gefunden, während in anderen Ländern der Anteil t034 höher war (**Abbildung 4**).

Hinsichtlich der *SCCmec*-Typen bestätigte sich die Dominanz des *SCCmec*-Typs V, der insgesamt in 84,8 % (123/145) der Isolate identifiziert wurde (Tabelle 9). Der *SCCmec* Typ III wurde in 14/17 Fällen bei Isolatentypen des *spa*-Typs t034 gefunden. Der *SCCmec*-Typ von 4 Isolatentypen war mit der im BfR etablierten Methode nicht zu ermitteln.

Erste Ergebnisse dieser Studie wurden auf Konferenzen als Poster oder Vortrag vorgestellt (Tenhagen et al. 2009b; Tenhagen et al. 2009a). Die Ergebnisse stimmen mit den zuvor bei Untersuchungen an Schlachthöfen und den zeitgleich an Zuchtschweinebeständen durchgeführten Untersuchungen weitgehend überein (EFSA 2009; Tenhagen et al. 2009c).

Tabelle 9: *Spa*-typen und ihre Beziehung zu den *SCCmec*-Typen bei den 145 Isolatentypen der Prävalenzstudie „MRSA in Mastschweinebeständen“

<i>Spa</i> -Typ	Anzahl Isolate (%)	<i>SCCmec</i> -Typ III (%)	<i>SCCmec</i> -Typ IVa (%)	<i>SCCmec</i> -Typ V (%)	<i>SCCmec</i> nicht typisierbar (%)
t011	96 (66,2)	1 (0,7)	1 (0,7)	91 (62,8)	3 (2,1)
t034	33 (22,8)	14 (9,7)		18 (12,4)	1 (0,7)
t108	4 (2,8)			4 (2,8)	
t571	2 (1,4)			2 (1,4)	
t1255	1 (0,7)			1 (0,7)	
t1451	3 (2,1)			3 (2,1)	
t1928	1 (0,7)	1 (0,7)			
t2383	1 (0,7)			1 (0,7)	
t2510	1 (0,7)			1 (0,7)	
t2582	1 (0,7)	1 (0,7)			
t2997	1 (0,7)			1 (0,7)	
t5488	1 (0,7)			1 (0,7)	
Total	145 (100)	17 (11,7)	1 (0,7)	123 (84,8)	4 (2,8)

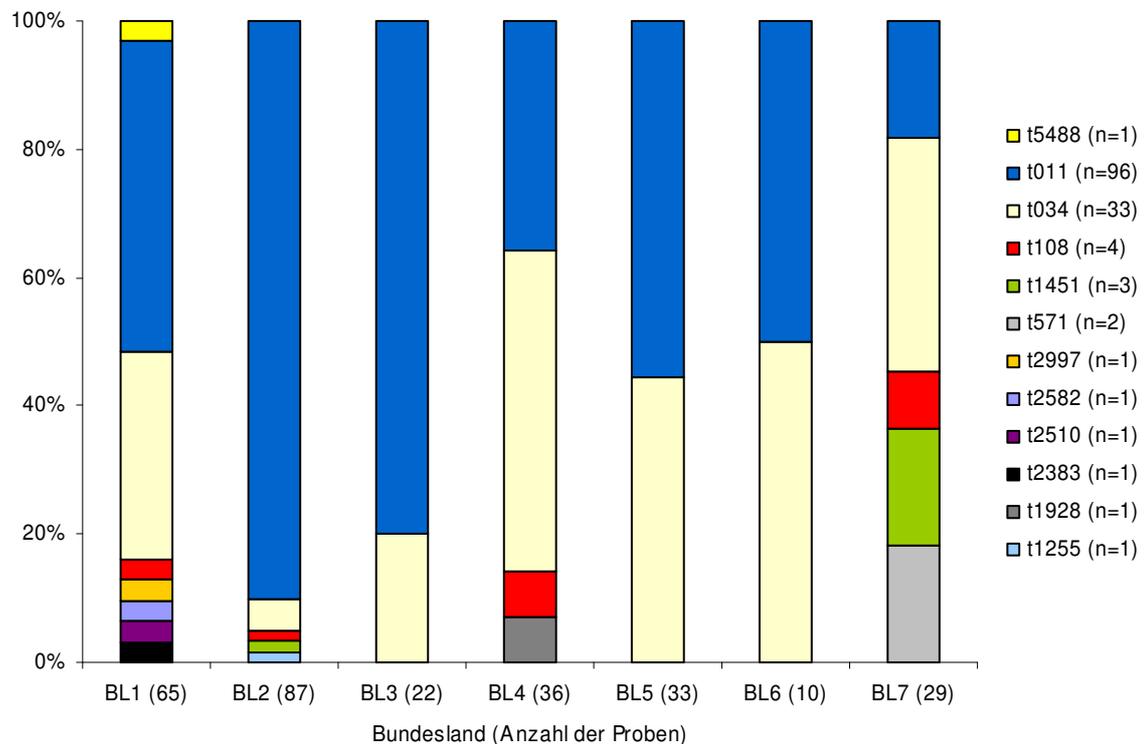


Abbildung 4 : Anteil verschiedener *spa*-Typen an den Isolaten in den Ländern.

Testung im Agardiffusionstest nach CLSI

Es wurden die Isolate der Mastschweinestudie getestet (n=145). **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** Abbildung 5 zeigt die Resistenz der Isolate gegenüber den 16 getesteten Substanzen. Erwartungsgemäß waren fast alle Isolate resistent oder vermindert empfindlich gegenüber den Beta-Laktamen Oxacillin und Methicillin. Auch bei den Isolaten, die phänotypisch nicht die Resistenz zeigten, konnte aber das *mecA*-Gen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass vereinzelt MRSA bei der Routine-Untersuchung übersehen werden können.

Auch gegenüber Tetrazyklinen waren fast alle Isolate resistent. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Studie an Schlachtschweinen, die im Winter 2007/2008 durchgeführt worden war (Tenhagen et al. 2009c) und mit den international verfügbaren Daten zum MLST-Typ ST398 (de Neeling et al. 2007; Wagenaar und van de Giessen 2009). Auch die häufigen Resistenzen gegen Clindamycin und Erythromycin (65 %), sowie die selteneren Resistenzen gegen Gentamicin, Kanamycin (je 12 %) und Ciprofloxacin (4%) stimmen mit diesen Ergebnissen überein.

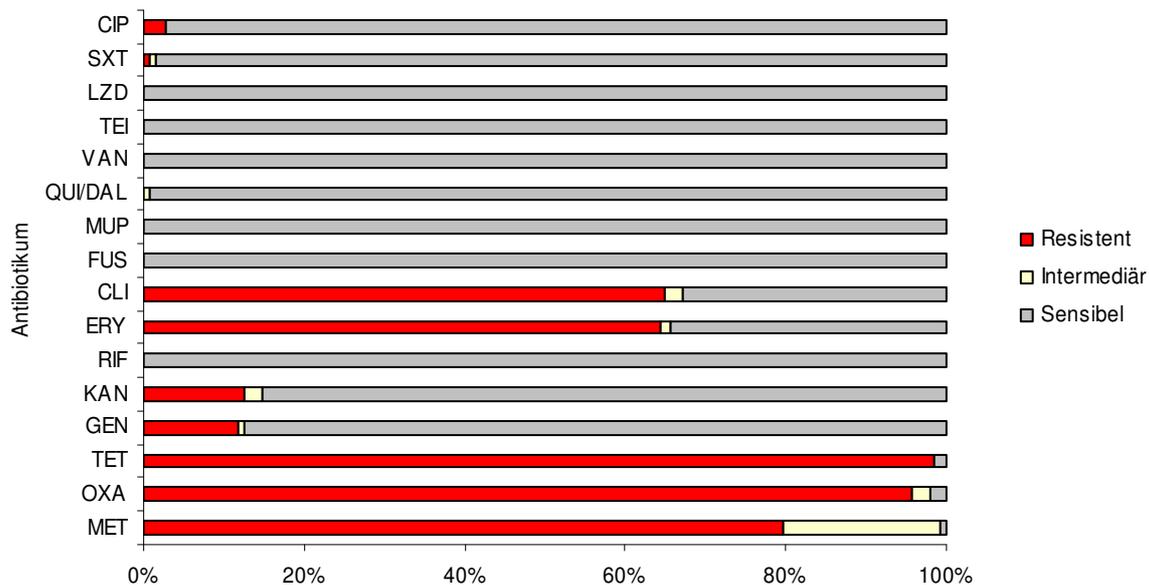


Abbildung 5: Resistenzen in 145 untersuchten Isolaten. MET: Methicillin; OXA: Oxacillin; TET: Tetrazyklin; GEN: Gentamicin; KAN: Kanamycin; RIF: Rifampicin; ERY: Erythromycin; CLI: Clindamycin; FUS: Fusidinsäure; MUP: Mupirocin; QUI/DAL: Quinupristin/Dalfopristin; VAN: Vancomycin; TEI: Teicoplanin; LZD: Linezolid; SXT: Sulfamethoxazol-Trimethoprim; CIP:Ciprofloxacin

3) Asservierte Isolate der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Außenstelle für Epidemiologie, Bakum, Niedersachsen

Es wurden insgesamt 60 MRSA-Isolate aus den Jahren 2004 bis 2007 typisiert (Meemken et al. 2009). Die Mehrzahl der Isolate (57/60, 95 %) gehörte dem MLST-Typ ST398 an. Von diesen waren wiederum die meisten (52/57) den *spa*-Typen t011 und t034 zuzuordnen. Drei Isolate gehörten dem MLST-Typ ST97 an. Dieser MLST-Typ tritt nur vereinzelt als MRSA beim Menschen auf, wird aber häufig in Mastitis-Isolaten vom Rind als Methicillin-sensibler *S. aureus* (MSSA) identifiziert.

Wie bei den Zucht- und Mast- und Schlachtschweinen (EFSA 2009; Tenhagen et al. 2009c) dominierten auch bei den in Bakum asservierten Isolaten die *SCCmec*-Typen V (80 %) und III (17 %), während 2 Isolate nicht typisierbar waren.

Diese Typisierungsergebnisse zeigen, dass MRSA bereits seit 2004 in einem erheblichen Maß in der regionalen Schweineproduktion vorkommen. Sie zeigen darüber hinaus, dass die Dominanz der *spa*-Typen t011 und t034 sowie der *SCCmec*-Typen V und III bereits seit mehreren Jahren besteht.

Im Rahmen dieser Studie wurden auch MSSA aus derselben Stammsammlung typisiert. Hierbei zeigte sich eine größere Variabilität der *spa*- und MLST-Typen. Unter den 16 typisier-

ten MSSA fanden sich 3 vom *spa*-Typ t011 (2) bzw. t034 (1). Ob es sich hierbei um Vorläufer der jetzt verbreiteten MRSA handelt oder möglicherweise auch um MRSA, die das *SCCmec* wieder verloren haben, kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Allerdings deutet der relativ geringe Anteil dieser Isolate darauf hin, dass der MLST Typ ST398 als MSSA keine überragende Bedeutung als Besiedler des Schweines hat.

Vier MSSA-Isolate gehörten zu *spa*-Typen (t012, t021, t318 (2x)), die dem MLST-Typ ST30 zuzuordnen sind. 8 Isolate wurden dem MLST-Typ ST9 zugeordnet. Von diesen gehörten 5 dem *spa*-Typ t337 an. Drei Isolate, trugen den *spa*-Typ t1430, der häufiger als MRSA von Masthähnchen und Masthähnchenfleisch isoliert wird (s.u. Punkt 4).

Tabelle 10: Ergebnisse der *spa*-Typisierung and *SCCmec*-Typisierung von 60 asservierten MRSA-Isolaten aus im Rahmen der Sektion von Schweinen gewonnenen Proben aus den Jahren 2004 bis 2007.

Jahr	2004	2005	2006	2007	2004-2007	% der Isolate
SCCmec-Typ						
<i>SCCmec V</i>	7	11	13	17	48	80
<i>SCCmec III</i>	4	3	2	1	10	17
<i>SCCmec n.t.</i>	0	1	1	0	2	3
Spa-Typ						
t011	4	7	7	13	31	52
t034	6	7	5	3	21	35
t108	1	0	2	1	4	7
t1451	0	0	1	0	1	2
t345	0	0	0	1*	1	2
n.t.	0	1*	1*	0	2	3

n.t. = nicht typisierbar; * = MLST: ST97

4) Ergebnisse der Typisierung von Isolaten aus Lebensmitteln

1. Vorkommen von MRSA in Lebensmitteln

Im Rahmen der Untersuchungen nach dem Zoonosen-Stichprobenplan für 2009 auf Grundlage der AVV Zoonosen Lebensmittelkette wurden von 6 Ländern zum Halbjahr Ergebnisse gemeldet (Tabelle 11). Diese Ergebnisse sind zwar nicht Teil der Untersuchungen im Rahmen dieses Projektes, dienen aber der Einordnung der Typisierungsergebnisse insbesondere in Lebensmitteln, weshalb sie hier dargestellt werden. Da es sich um Daten aus nur 6 Ländern handelt, ist es nicht möglich, das Ergebnis für ganz Deutschland zu extrapolieren. Allerdings zeigt sich eine deutliche Tendenz im Hinblick auf die unterschiedlichen Lebensmittel.

Insgesamt waren 32 % der untersuchten Proben positiv für MRSA, ein Ergebnis, das deutlich über den Daten aus den Niederlanden liegt (de Boer et al. 2009). Besonders hohe Nachweisraten wurden für Puten während der Schlachtung (93 %) sowie für Putenfleisch (61 %) berichtet. Auch Proben von Schweinehackfleisch (40 %) und Hähnchenfleisch (29 %) waren häufig positiv.

Aus den Ergebnissen lässt sich erkennen, dass MRSA im Lebensmittel häufig vorkommen. Da alle Untersuchungen mit dem Verfahren der selektiven Anreicherung durchgeführt wurden lässt sich aus den Ergebnissen nicht ableiten, mit welcher Keimzahl MRSA in den untersuchten Lebensmitteln vorkommen. Bisherige Daten deuteten darauf hin, dass die Keimzahlen eher gering sind. Weitere Untersuchungen zur Quantifizierung, für die im Rahmen des Projekts methodische Vorarbeiten geleistet wurden sind jedoch dringend erforderlich. Weiterhin deuten die Ergebnisse auf die hohe Bedeutung der Typisierung von MRSA aus Lebensmitteln hin, um eine Exposition des Verbrauchers mit neuen Stämmen frühzeitig zu erkennen.

Tabelle 11: Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmitteln bzw. Schlachttieren auf MRSA. Daten im Rahmen des Zoonosen-Stichprobenplans für 2009 nach AVV Zoonosen Lebensmittelkette erhoben. Meldungen aus 6 Ländern über das erste Halbjahr 2009.

Probenahmeort / Lebensmittel	Anzahl positive	Anteil positive (%)	Anzahl negative	Anzahl untersuchte
EH* Schweinefleisch	20	17,1	97	117
EH Schweinehackfleisch	33	40,2	49	82
EH Schweinefleischzubereitung	5	17,9	23	28
Schlachthof: Kälber	1	5,0	19	20
EH Kalbfleisch	13	15,1	73	86
EH Kalbfleischzubereitung	1	11,1	8	9
EH Hähnchenfleisch	27	28,7	67	94
EH Hähnchenfleischzubereitung	4	15,4	22	26
Schlachthof: Puten	28	93,3	2	30
EH Putenfleisch	56	64,4	31	87
EH Putenfleischzubereitung	9	31,0	20	29
Gesamt	197	32,4	411	608

*EH: Einzelhandel

2. Typisierungsergebnisse bei MRSA aus Lebensmitteln

Insgesamt wurden 377 Isolate aus Lebensmitteln typisiert. Von diesen Isolaten konnten anhand ihres *spa*-Typs 320 (84,9 %) dem MLST-Typ ST398 zugeordnet werden (Tabelle 12). Die übrigen Isolate konnten insgesamt 7 verschiedenen MLST-Typen zugeordnet werden. Diese Ergebnisse entsprechen den für die Niederlande publizierten Ergebnissen (de Boer et al. 2009).

Von den Isolaten des MLST-Typs ST398 gehörten die meisten (298/320, 93,1 %) den *spa*-Typen t011 (196 Isolate) und t034 (102 Isolate) an. Dies galt grundsätzlich für alle betrachteten Herkünfte, wobei der Anteil bei den individuellen Herkünften zwischen 85 % (Milch) und

100 % (Kalbfleisch) variierte. Alle anderen *spa*-Typen wurden nur zwischen 1 und 6 (t1451) Mal nachgewiesen.

Bei den Isolaten anderer MLST-Typen dominierte der MLST-Typ ST9. Dieser wurde in 34 der 57 Non-ST398 Isolate identifiziert. Es handelte sich dabei ausnahmslos um den *spa*-Typ t1430 und die Isolate stammten alle aus Fleisch vom Huhn.

Der Typ ST5 wurde in 13 Proben nachgewiesen. Dabei handelte es sich in 9 Fällen um Proben aus Putenfleisch bzw. –zubereitungen und in 3 Fällen um Hähnchenfleisch. Zwölf der 13 Isolate gehörten zum *spa*-Typ t002, der in der Bevölkerung relativ weit verbreitet ist. Sein Anteil an den Meldungen an den Ridom-*Spa*-Server liegt bei 5,5 % (Stand 14.12.2009). Die Isolate stammten aus unterschiedlichen Untersuchungseinrichtungen, so dass ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen den Isolaten nicht herzustellen ist.

Insgesamt legen die Ergebnisse der Typisierung der Lebensmittelisolate den Schluss nahe, dass die meisten dieser Isolate aus der Primärproduktion stammen. Es kommt im Rahmen der Lebensmittelgewinnung zwar zu einer Verringerung der Belastung, wie die longitudinale Studie in der Produktionskette und der geringere Anteil positiver Lebensmittelproben zeigt. Es gelingt aber bisher nicht, den Übertrag vollständig zu unterbinden.

Das Vorkommen nicht zum MLST-Typ ST398 zugehöriger Isolate hat 2 verschiedene Erklärungen. Eine Erklärung liegt in der sekundären Kontamination von Lebensmitteln durch mögliche Träger von MRSA, die in der Verarbeitung tätig sind. Dies kann den Eintrag von MRSA-Typen erklären, die beim Menschen häufig nachgewiesen werden (*spa* Typ t002, ST 5).

Eine weitere Erklärung ist das Vorkommen von anderen MLST-Typen in der Primärproduktion. Dieser Schluss liegt für den *spa*-Typ t1430 (ST9) nahe. Dieser wurde fast ausschließlich im Hähnchenfleisch nachgewiesen. Untersuchungen in den Niederlanden haben diesen *spa*-Typ in Hähnchen-Schlachthöfen gefunden, und zwar unter anderem in den Transportkisten, die die Hähnchen zum Schlachthof brachten (Mulders et al. 2009). Interessanterweise kommt dieser *spa*-Typ auch beim Schwein vor, wenn auch als MSSA (asservierte Isolate aus Bakum). Es ist also davon auszugehen, dass er, wenn auch in geringerem Maße als der Typ ST398, in der Primärproduktion verbreitet ist (Fetsch et al. 2009a).

Bei den weiteren in Lebensmitteln nachgewiesenen *spa*-Typen ist die Zahl der Nachweise bisher so gering, dass ein Rückschluss auf mögliche Quellen nicht möglich ist und auch wenig aufschlussreich wäre. Zwischenergebnisse zu diesen Untersuchungen wurden im Rahmen des BfR-Symposium „Zoonosen und Lebensmittelsicherheit“ vorgetragen (Fetsch et al. 2009b). Insgesamt stimmen diese Ergebnisse mit den aus den Niederlanden publizierten Daten überein.

Tabelle 12: MLST- und *spa*-Typen der Isolate aus Lebensmitteln

Tierart	Fleisch und Fleischzubereitungen						Gesamt
	nicht spezifiziert	Huhn	Pute	Schwein	Kalb	Milch	
ST398 gesamt	20	107	79	87	20	7	320
t011	15	62	50	52	16	1	196
t034	3	33	28	29	4	5	102
t037	0	1	0	0	0	0	1
t108	0	1	0	0	0	0	1
t1255	0	1	0	0	0	0	1
t1451	1	2	0	3	0	0	6
t1456	0	0	0	1	0	0	1
t1457	0	0	0	0	0	1	1
t1580	0	1	0	0	0	0	1
t1606	0	0	0	1	0	0	1
t2510	0	0	1	0	0	0	1
t2576	0	2	0	1	0	0	3
t2970	0	1	0	0	0	0	1
t3423	1	0	0	0	0	0	1
t5505	0	1	0	0	0	0	1
t5524	0	1	0	0	0	0	1
t899	0	1	0	0	0	0	1
t985	0	1	1	0	0	0	2
Non ST398	4	39	10	4	0	0	57
ST1 T127	0	1	0	1	0	0	2
ST5 T002	1	2	9	0	0	0	12
ST5 T214	0	1	0	0	0	0	1
ST8 T008	0	0	0	1	0	0	1
ST9 T1430	0	34	0	0	0	0	34
ST45 t015	0	0	0	1	0	0	1
ST217 t032	2	0	0	0	0	0	2
ST225 t003	0	0	0	1	0	0	1
ST80 t044	1	0	0	0	0	0	1
Gesamt	24	146	89	91	20	7	377

3. Resistenz von Isolaten aus Lebensmitteln gegen antimikrobielle Substanzen

Im Hinblick auf die Antibiotikaresistenz verhalten sich die aus Lebensmitteln isolierten MRSA vom Typ ST398 ähnlich denen aus der Primärproduktion, was die Vermutung unterstützt, dass diese Stämme aus der Primärproduktion stammen. Die Isolate sind fast durchweg resistent gegen Tetrazyklin und Oxacillin, häufig gegen Erythromycin und Clindamycin, etwas weniger häufig gegen Gentamicin und Kanamycin und selten gegen Chloramphenicol, Ciprofloxacin und Fusidinsäure. Gegen die humanmedizinisch bedeutsamen Substanzen Linezolid und Vancomycin sind nur einzelne Isolate resistent (Abbildung 7).

MRSA anderer MLST-Typen wurden in den meisten Lebensmitteln selten nachgewiesen. Lediglich in Fleisch und Fleischzubereitungen vom Huhn wurden in nennenswertem Ausmaß andere MLST-Typen nachgewiesen. Dabei handelte es sich durchweg um den MLST-Typ ST9 und den *spa*-Typ t1430. Die 31 getesteten Isolate wiesen seltener eine Resistenz gegen Tetrazyklin auf (71 %), dafür aber häufig gegen Ciprofloxacin (97 %). Hinsichtlich der anderen Substanzen unterschieden sie sich nicht wesentlich von den ST398 Isolaten (Abbildung 8).

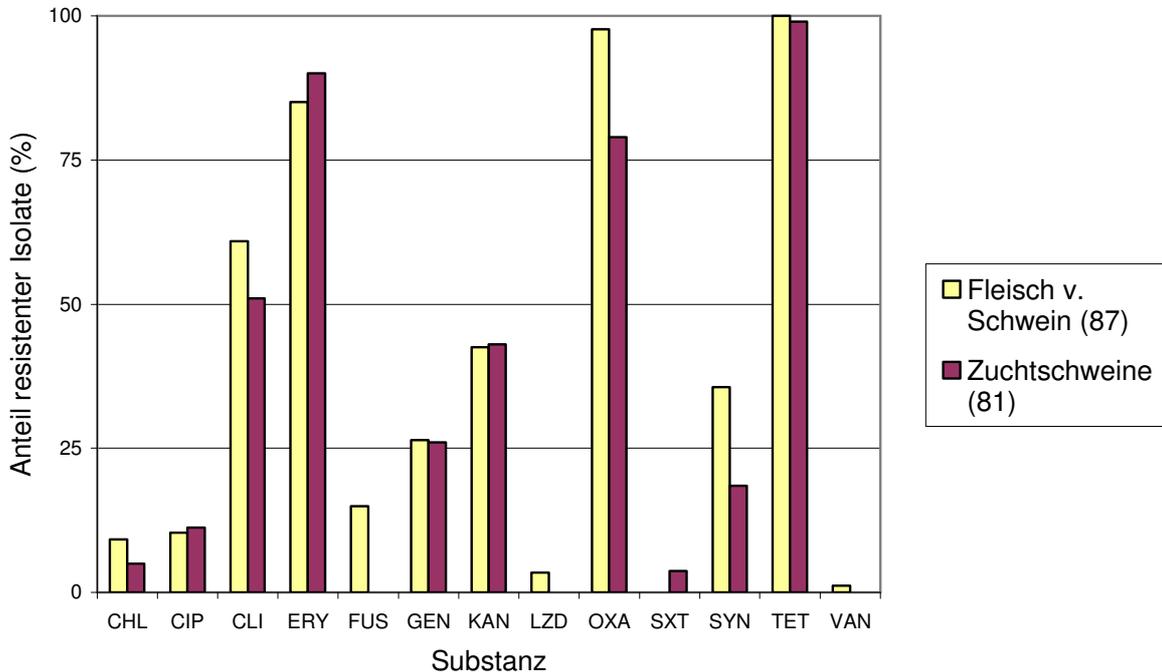


Abbildung 6: Vergleich der Resistenz von Isolaten aus Zuchtschweinebeständen mit solchen aus Schweinefleisch und Schweinefleischzubereitungen

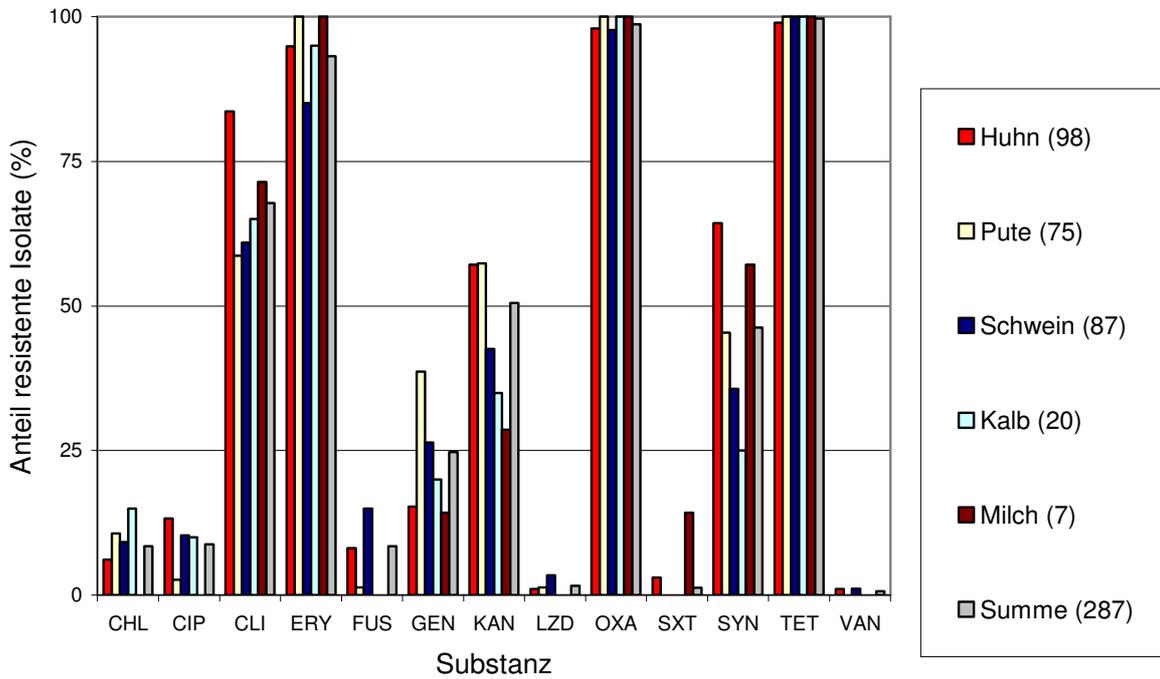


Abbildung 7: Resistenz von MRSA ST398 Isolaten (n=287) aus Fleisch und Fleischzubereitungen unterschiedlicher Tierarten sowie aus Milch gegen antimikrobielle Substanzen.

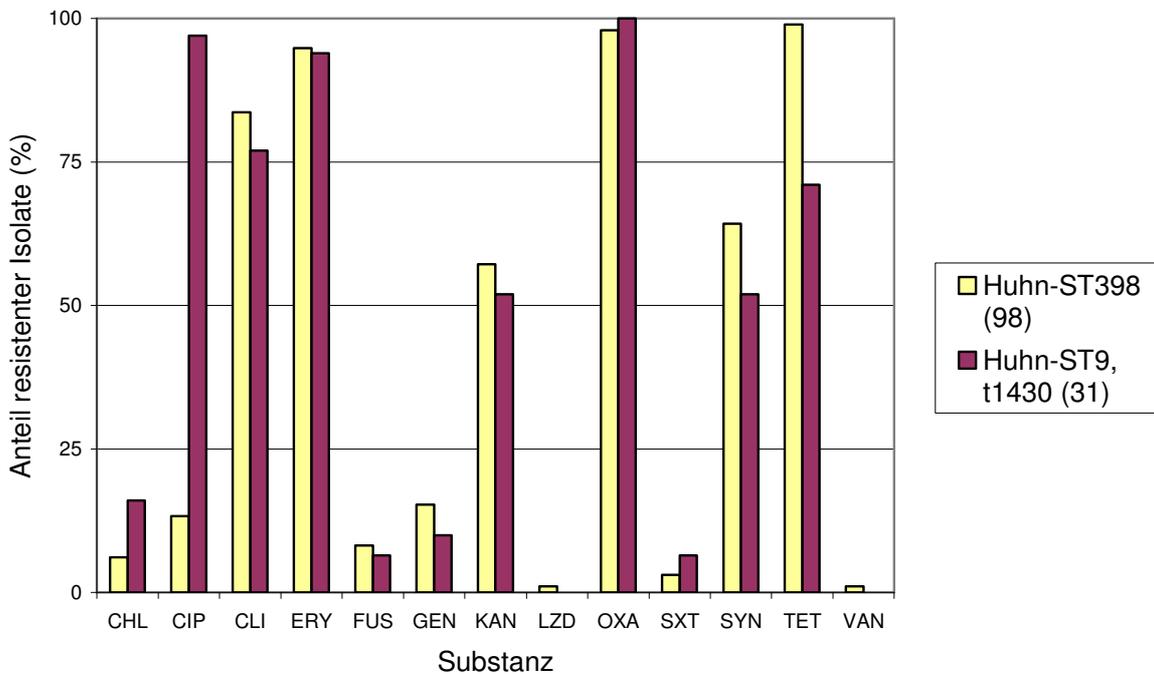


Abbildung 8: Vergleich der Antibiotikaresistenz von Isolaten aus Fleisch und Fleischzubereitungen vom Huhn, die den MLST-Typen ST398 und ST9 angehören

5) Weitere Typisierungsergebnisse

Isolate aus Milchviehbeständen in Baden-Württemberg

Im Rahmen eines Mastitisgeschehens auf mehreren Milchviehbetrieben in Südwest-Deutschland wurden dem BfR vom Eutergesundheitsdienst der Tierseuchenkasse Baden-Württemberg Isolate zur Verfügung gestellt, die mit wenigen Ausnahmen dem *spa*-Typ t011 zugeordnet werden konnten. Gleichzeitig liegen aus einem der Betriebe Isolate aus Schweinebeständen desselben Betriebs vor und von Mitarbeitern vor, die in den Schweinebeständen, teilweise aber auch nur im Milchviehbereich arbeiten. Diese sind ebenfalls dem Typen t011 zuzuordnen. Durch die PFGE nach enzymatischem Verdau mit dem Enzym *cfr91*, konnten die Isolate mehreren Subtypen zugeordnet werden, so dass von einem mehrfachen Eintrag von MRSA in die betroffene Milchviehherde auszugehen ist.

Die zwei anderen Milchviehbestände wiesen keinen Kontakt zu Schweinen auf. Dies deutet darauf hin, dass der Eintrag der MRSA in diese Bestände nicht von Schweinen ausgegangen ist. Die Quelle des Eintrags konnte hier nicht ermittelt werden.

In den Betrieben wiesen Euterviertel, aus denen MRSA isoliert werden konnten, höhere somatische Zellzahlen auf, als Viertel ohne Erregernachweis. Dies deutet auf ein mit dem Nachweis der Erreger verbundenes Mastitisgeschehen hin.

Der Nachweis von t011 im Rahmen dieses Geschehens und der Nachweis von MRSA vom Typ t011 und t034 aus der Anlieferungsmilch deuten darauf hin, dass nutztierassoziierte MRSA auch in Milchviehbeständen vorkommen. Dies wirft besondere Probleme auf, da der Nachweis im Gegensatz zum Schwein, mit Symptomen einer Erkrankung verbunden ist, so dass sowohl aus Sicht der Tiergesundheit (Tierschutzaspekt) als auch aus Sicht der Lebensmittelqualität Bekämpfungsmaßnahmen ergriffen werden müssen. Die bisher für die Bekämpfung von *Staphylococcus aureus* als Mastitiserreger entwickelten Bekämpfungskonzepte sehen den Einsatz von antimikrobiellen Substanzen als Bestandteil eines Gesamtkonzeptes vor. Dieser Weg ist bei MRSA in der Form nicht zu gehen, weil die für die Therapie der Mastitis des Rindes zugelassenen Wirkstoffe ganz überwiegend Beta-Laktam-Antibiotika sind.

Isolate von *Staphylococcus aureus* aus Milchproben in Brandenburg (2001/2002)

Die Typisierung von Isolaten von *Staphylococcus aureus* aus Milchproben, die in Brandenburg in den Jahren 2001 und 2002 gewonnen wurden, ergab ein sehr heterogenes Muster. Es handelte sich durchweg um MSSA. Von 46 typisierten Isolaten enthielten 3 einen bisher unbekanntem *spa*-Typen. Die häufigsten *spa*-Typen waren die Typen t1403 (ST132) und t211 (ST8), aber auch *spa*-Typen, die dem MLST-Typ ST97 zuzuordnen sind, waren häufig.

Dabei handelte es sich um 6 verschiedene *spa*-Typen (t224, t267, t359, t521, t527, t1182). Interessanterweise war keiner der untersuchten *S. aureus*-Stämme vom MLST-Typ ST398. Dies deutet darauf hin, dass der Nachweis von MRSA diesen Typs tatsächlich eine neue Erscheinung ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch aus Dänemark berichtet (Hasman et al. 2009)

Heterogenität von MRSA-Isolaten in einem Putenschlachthof in Baden-Württemberg

In dieser Untersuchung wurden 26 MRSA-Isolate die von Putenschlachtkörpern eines Schlachthofs in Baden-Württemberg isoliert worden waren näher untersucht. An den drei Untersuchungstagen waren sämtliche Proben jeweils positiv für MRSA. Bei der *spa*-Typisierung wiesen 24 der 26 Isolate den Typ t011 auf. Die beiden übrigen Isolate waren vom Typ t034. Die *SCCmec*-Typisierung der Isolate ergab zwei verschiedene *SCCmec*-Typen sowie ein nicht typisierbares Isolat. Die beiden t034 Isolate trugen den *SCCmec* vom Typ V. Die t011-Isolate gehörten in 14 Fällen zum Typ IVa und in 9 Fällen zum Typ V. Ein t011 Isolat war nicht typisierbar. Anhand der Fingerprints, die mittels der PFGE nach Verdau mit *cfr91* erstellt wurden, waren insgesamt 6 verschiedene Typen zu differenzieren, von denen jeweils 2 bis 3 am selben Schlachtttag auftraten.

Die Ergebnisse dieser kleinen Studie zeigen, dass die alleinige Typisierung der MRSA durch die *spa*-Typisierung keine hinreichende Diskriminierungskraft zeigt, um Beziehungen zwischen Isolaten aus einem einheitlichen Setting aufzuklären. Die zusätzliche Typisierung der *SCCmec* verbessert die Diskrimination nur mäßig. Beide Typisierungen sind für die Einordnung der Isolate wichtig. Für die epidemiologische Aufklärung von Zusammenhängen zwischen den Isolaten sind aber weitere Differenzierungsschritte erforderlich.

Die Ergebnisse deuten weiterhin darauf hin, dass Putenschlachtkörper, zumindest in diesem Schlachthof, in erheblichem Maße belastet sind und die Belastung nicht allein auf die Verschleppung im Schlachthof zurückzuführen ist, da unterschiedliche Stämme identifiziert werden konnten.

Erste Ergebnisse aus einem Kooperationsprojekt mit dem CVUA Karlsruhe deuten darauf hin, dass in Baden-Württemberg auch die Putenstände zu einem erheblichen Anteil mit MRSA belastet sind, so dass von einem wiederholten Eintrag in den Schlachthof über unterschiedliche Schlachtchargen auszugehen ist. Ob es darüber hinaus durch den Schlachtprozess zur Verschleppung zwischen Schlachttieren und -chargen kommt, kann aus den vorliegenden Daten nicht sicher abgeleitet werden, liegt aber nahe.

Isolate aus einer Frischfleisch-Produktionskette in Nordrhein-Westfalen

Im Rahmen einer longitudinalen Untersuchung in einem Betrieb, der die gesamte Produktionskette von der Schlachtung bis zum vermarktungsfähigen Frischfleischprodukt abdeckte, wurden insgesamt 52 Isolate typisiert (Beneke et al. 2009). Diese gehörten 5 *spa*-Typen an, die allesamt dem MLST-Typ ST398 zugeordnet werden können (t011, t034, t108, t2346, t3479). Während sich bei den Isolaten, die aus Nasentupfern der Schlachtschweine gewonnen wurden, alle 5 unterschiedlichen *spa*-Typen fanden, wurden in der weiteren Verarbeitung nur noch die *spa*-Typen t011 und t034 gefunden. Allerdings war die Häufigkeit des Nachweises in der weiteren Produktionskette erwartungsgemäß gering (7 Isolate gegenüber 45 Isolaten von den Schlachtschweinen). Daher kann aus den Ergebnissen nicht auf eine selektive Begünstigung dieser *spa*-Typen durch den Verarbeitungsprozess geschlossen werden. Insgesamt zeigt der seltenere Nachweis von MRSA auf den Stufen der Verarbeitung, dass mit einer angemessenen Schlachthygiene beim Schwein der Übertrag von MRSA vom Schlacht tier auf den Schlachtkörper stark begrenzt werden kann.

6) Untersuchungen zum Vorliegen von virulenz- und resistenzassoziierten Genen

Eine Auswahl von 105 MRSA ST398 Isolaten aus unterschiedlichen Herkünften wurde auf das Vorliegen unterschiedlicher Virulenzfaktoren untersucht (Argudin et al. 2009a). Die Isolate stammten aus Nasentupfern von Schlachtschweinen, Staubproben aus Schweinebeständen, klinischen Isolaten vom Schwein, Milchproben vom Rind sowie Karkassen und Fleisch verschiedener Tierarten (Rind, Schwein, Hähnchen, Pute). In dieser Selektion waren unterschiedliche phänotypische Resistenzprofile, *spa*- und *SCCmec*-Typen vertreten. Zum Vergleich wurden auch 6 Isolate hinzugezogen, die nicht dem MLST-Typ ST398 zuzuordnen waren.

Es zeigte sich, dass keines der 105 untersuchten Isolate vom MLST-Typ ST398 über Gene für die klinisch relevanten Leukotoxine, Exfoliatine oder TSST verfügte, während diese bei den Kontrollisolaten nachweisbar waren. Lediglich bei 2 Isolaten wurde jeweils ein Gen, welches für ein Enterotoxin kodiert nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte die Präsenz der Gene für die Hämolyse a, b und d sowie die Zugehörigkeit zum quorum sensing System *agr I* für alle Isolate gezeigt werden. Bei 103 Isolaten war die Untersuchung auf das Gen für Hämolyse g positiv (Argudin et al. 2009a).

Tabelle 13 gibt eine Übersicht der Untersuchungen zum Vorliegen von Resistenzgenen bei den untersuchten MRSA wieder. Alle ST398 Isolate waren tetrazyklinresistent und trugen das Resistenzgen *tet(M)* zusammen mit einem oder zwei plasmidassoziierten Genen [*tet(K)* und *tet(L)* (18%), *tet(K)* (51%), *tet(L)* (22%)]. Für Erythromycin- (68,6%) und Clindamycin- (58,1%) resistente Isolate ließen sich 8 Profile feststellen: [*ermA*, *ermB*, *ermC* (8,2%), *ermA*, *ermB* (19,2%), *ermA*, *ermC* (8,2%), *ermB*, *ermC* (1,4%), *ermA* (11%), *ermB* (12,3%), *ermC* (35,6%), nicht typisierbar (4,1%)]. Folgende Gene, die Resistenz gegen Trimethoprim verleihen wurden gefunden: *dfrS1* (1%), *dfrD* (1%), *dfrG* (22,9) und *dfrK* (40%). Neun Isolate (8,6%) waren phenicolresistent und trugen das Gen *fecA*. Folgende Resistenzgene gegen Aminoglykoside wurden nachgewiesen: *aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia* (12,4%), *ant(4′)-Ia* (36,2%), *aph(3′)-IIIa* (1,9). Viele dieser Isolate waren nicht phänotypisch resistent gegen Kanamycin oder Gentamicin obwohl Resistenzgene nachgewiesen wurden. Keines der 8 untersuchten Resistenzgene gegen Streptogramine wurde bei entsprechend resistenten Isolaten gefunden. Vier Isolate (3,8%) trugen *linA/linA′* als Resistenzgene gegen Lincosamide.

Tabelle 13 Ergebnisse der Untersuchung von MRSA Isolaten auf Resistenzgene

Resistenz Gruppe	Gen	Anzahl positiver Isolate
Methicillin/Oxacillin	SCC <i>mec</i> III	11
	SCC <i>mec</i> IVa	5
	SCC <i>mec</i> V	80
Aminoglykoside	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia	13
	<i>ant</i> (4')-Ia	38
	<i>ant</i> (4')-Ia	2
Tetrazyklin	<i>tetK</i>	74
	<i>tetL</i>	41
	<i>tetM</i>	105
	<i>tetO</i>	0
Macrolide/Lincosamide	<i>ermA</i>	36
	<i>ermB</i>	32
	<i>ermC</i>	42
Makrolide	<i>msrA</i>	0
	<i>msrB</i>	0
Lincosamide	<i>linA/linA'</i>	4
Phenicole	<i>cat</i> pC194	0
	<i>cat</i> pC221	0
	<i>cat</i> pC223	0
	<i>fexA</i>	2
Trimethoprim	<i>dfrD</i>	1
	<i>dfrG</i>	24
	<i>dfrS1</i>	1
	<i>dfrK</i>	42
Streptogramine	<i>vatA</i>	0
	<i>vatB</i>	0
	<i>vatC</i>	0
	<i>vgaA</i>	0
	<i>vgaB</i>	0
	<i>vgaC</i>	0
	<i>vgbA</i>	0
	<i>vgbB</i>	0
Multiresistenz	<i>cfr</i>	0

Eine Beziehung zwischen bestimmten Resistenzgenen und SCC*mec*-Typen wurde festgestellt. Die meisten Isolate mit SCC*mec* III trugen *ermA*, welches mit dem Transposon Tn554 in diesem Kassettentyp assoziiert ist. Das episomal kodierte *tet*(K) wurde nur in Isolaten mit SCC*mec*-Typ V nachgewiesen.

Alle Isolate des Typs ST398 waren tetrazyklinresistent und trugen das Gen *tet*(M) zusammen mit anderen, plasmidvermittelten Resistenzgenen gegen Tetrazyklin. Die meisten Isola-

te (69%) waren resistent gegen Erythromycin/Clindamycin und trugen verschiedene Kombinationen des *erm*-Gens.

Zusammenfassend mit den Ergebnissen der genotypischen Resistenzbestimmung kann davon ausgegangen werden, dass die aktuell isolierten MRSA ST398 keine herausragenden Pathogenitätseigenschaften besitzen. Dennoch besteht grundsätzlich die Möglichkeit der Steigerung der Virulenz durch Austausch von genetischem Material innerhalb derselben und zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies. Ergebnisse der Kollegen aus den Niederlanden deuten darauf hin, dass MRSA vom Typ ST398 für einen solchen Austausch besonders empfänglich sind (Wagenaar und van de Giessen 2009).

4.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die etablierten Methoden zur Probenahme auf Schlachtkörperoberflächen sowie zur Quantifizierung der MRSA in Lebensmitteln sowie das optimierte Nachweisverfahren für MRSA im Lebensmittel können den Landesuntersuchungseinrichtungen zur Verfügung gestellt werden, damit bei Bedarf auch die Quantifizierung von MRSA in und auf Matrices mit validierten Methoden möglich ist. Darüber hinaus ist ein Einsatz der Methoden im Rahmen der Prozesskontrolle in Schlachtbetrieben und in Betrieben der Lebensmittelverarbeitung denkbar. Dies ermöglicht es den Betrieben, MRSA in ihre Maßnahmen zur Qualitätssicherung einzubeziehen, ggf. kritische Kontrollpunkte zu definieren und die Kontrollen an diesen Punkten durchzuführen. Dies verbessert den Schutz des Verbrauchers vor vom Tier stammenden MRSA und trägt somit national und international zum hohen Qualitätsstandard deutscher Lebensmittel bei.

Damit leistet die Entwicklung der Methoden einen entscheidenden Beitrag zum Schutz des Verbrauchers vor vom Tier stammenden MRSA.

Da die Problematik von MRSA in der Lebensmittelkette auch international, sowohl im Rahmen der EU als auch darüber hinaus, intensiv diskutiert wird, werden damit die deutsche Lebensmittelindustrie und die Überwachungsbehörden in die Lage versetzt, etwaigen Anforderungen des internationalen Handels frühzeitig gerecht zu werden.

Aufbauend auf den etablierten quantitativen Methoden zur Untersuchung von Lebensmitteln auf MRSA können diese für quantitative Untersuchungen auch in anderen Bereichen, insbesondere in der Primärproduktion weiterentwickelt werden und somit die Überwachung der Tierbestände verbessert sowie die Effektivität hygienischer Maßnahmen geprüft und ggf. optimiert werden.

Mit der Etablierung und Anwendung der unterschiedlichen Methoden für die Typisierung und Charakterisierung von MRSA aus unterschiedlichen Stufen der Lebensmittelkette stehen nunmehr Ausgangswerte für die weitere Beobachtung der Entwicklung zur Verfügung. Mit den Methoden der Multi-Locus Sequenztypisierung und der *spa*-Typisierung stehen Methoden zur Verfügung, die eine international vergleichbare Typisierung der Isolate ermöglichen. Die Ergebnisse der Typisierung von Isolaten unterschiedlicher Herkünfte zeigen das hohe Maß an Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Lebensmittelketten. Sie zeigen aber auch auf, an welchen Stellen sich weitere Herausforderungen für die Sicherung der Lebensmittelqualität ergeben.

Mit der neu entwickelten Methode der Pulsfeld Gelelektrophorese auf der Grundlage eines Verdau der DNA mit dem Enzym *cfr91* steht ein Instrument zur Verfügung, mit dem einerseits Isolate desselben *spa*-Typs weiter unterschieden werden können. Dies ist von besonderer Bedeutung weil die meisten der Isolate nur zwei *spa*-Typen zugehören. Auch durch die zusätzliche Typisierung des *SCCmec* wird nur ein geringer Fortschritt in der Diskriminationsfähigkeit erzielt, weil es auch hier vorwiegend 2 Ausprägungen (*SCCmec* III und V) gibt. Diese zusätzliche Möglichkeit der weiteren Differenzierung von Stämmen ist insbesondere bei der Aufklärung möglicher Infektketten von Bedeutung, da in solchen Fällen, die Diskriminationskraft der *spa*-Typisierung aufgrund der begrenzten Variabilität dieses Gens nicht ausreichend ist.

Andererseits führt der Verdau mit einem Neoschizomer des bisherigen Standardenzym *SmaI* zu einem dem *SmaI* vergleichbaren Bandenmuster, so dass die Isolate nicht nur mit anderen ST398 Isolaten zu vergleichen sind, sondern auch mit den Mustern, die sich bei anderen Sequenztypen durch den Verdau mit *SmaI* ergeben. Dies bietet für die Landesuntersuchungseinrichtungen auch den Vorteil, dass bereits etablierte Methoden zur PFGE nur modifiziert werden müssen und somit vorhandene Erfahrungen mit diesen Methoden weiter nutzbar sind.

Die Ergebnisse der Typisierung bestätigen in weiten Teilen die Erwartung, dass MRSA vom Typ ST398 sich in den verschiedenen Bereichen der Tierproduktion ausgebreitet haben, d.h. kein alleiniges Problem von Schweinen sind, wie dies ursprünglich zu vermuten war.

Die Typisierung der asservierten Isolate von MRSA aus der Außenstelle für Epidemiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover in Bakum, Niedersachsen zeigen, dass MRSA in der Schweineproduktion der Region zumindest seit 2004 vorkommen und dass zu diesem Zeitpunkt auch schon dieselben *spa*-Typen vorherrschend waren. Der Nachweis von MSSA des Typs ST398 bei den Schweinen könnte darauf hindeuten, dass dieser Typ auch schon früher in der Schweinepopulation vorkam.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen wurden Isolate von Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) aus unterschiedlichen Stufen verschiedener Lebensmittelketten näher charakterisiert, auf ihre Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen untersucht sowie ihre Virulenzeigenschaften untersucht. Die Isolate entstammten teilweise den Amtsaufgaben des BfR (Nationales Referenzlabor (NRL) für Antibiotikaresistenz und NRL für Koagulase positive Staphylokokken einschließlich *Staphylococcus aureus*), überwiegend aber aus gezielten Forschungsprojekten zum Vorkommen von MRSA in der Lebensmittelkette.

Die Isolate wurden anhand etablierter Typisierungsmethoden (*spa*-Typisierung, Multi Locus Sequenztypisierung (MLST), Typisierung des Staphylococcal cassette chromosomes *mec* (SCC*mec*-Typisierung) charakterisiert. Zur Verbesserung der Diskriminationsfähigkeit der molekularbiologischen Untersuchungen wurde eine neue Methode zum Vergleich von Isolaten mittels der Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) entwickelt. Diese baute auf dem international anerkannten HARMONY-Protokoll auf, verwandte jedoch ein Neoschizomer (cfr91) des im HARMONY-Protokoll verwandten Restriktionsenzym *Sma*I. Mit dem *Sma*I können MRSA vom Typ ST398 nicht typisiert werden. Die Ergebnisse der PFGE nach Restriktionsverdau mit cfr91 sind unmittelbar mit den Ergebnissen nach Verdau anderer *S. aureus* Stämme mit *Sma*I vergleichbar, so dass nunmehr auch mit dieser Methode ein Vergleich von MRSA des Typs ST398 mit anderen Typen möglich ist.

Die Ergebnisse der Typisierung der Isolate unterschiedlicher Herkünfte zeigten, dass in allen Stufen der verschiedenen Lebensmittelketten der MLST-Typ ST398 überwiegt. Hinsichtlich der *spa*-Typisierung dominieren die beiden *spa*-Typen t011 und t034, wobei es in der Population regionale Unterschiede gibt in der Dominanz jeweils eines dieser *spa*-Typen. Hinsichtlich der SCC*mec*-Typisierung dominiert der Typ V. Daneben kommen vor allem Kassetten vom Typ III und vom Typ IVa vor. Auch dieser Befund ist unabhängig von der Stufe oder Art der Lebensmittelkette.

Auch das Resistenzmuster der aus den verschiedenen Lebensmittelketten isolierten MRSA vom Typ ST398 ist weitgehend homogen. Neben der Resistenz gegen Beta-Laktam Antibiotika dominieren die Resistenz gegen Tetrazyklin (fast 100 %), sowie gegen Erythromycin und Clindamycin (50 bis 80 %). Daneben sind Resistenzen gegen Gentamicin und Kanamycin regelmäßig zu beobachten. Die genetische Grundlage der Resistenz gegen Tetrazyklin besteht bei allen untersuchten Isolaten vom Typ ST398 im Gen *tetM*. Allerdings wird dieses häufig durch andere Gene (v.a. *tetK*) ergänzt. Hinsichtlich der Resistenz gegen Lincosamide kommen die drei Gene *ermA*, *ermB* und *ermC* zu etwa gleichen Teilen und in unterschiedli-

chen Kombinationen vor. Resistenzgene gegen Streptogramine wurden in der untersuchten Population nicht nachgewiesen.

Besonderheiten ergeben sich in der Lebensmittelkette Hähnchenfleisch. Hier wird neben dem MLST-Typen ST398 ein zweiter MLST-Typ nachgewiesen, der Typ ST9 mit dem *spa*-Typen t1430. Dieser Typ unterscheidet sich hinsichtlich seiner Resistenzeigenschaften vom vorherrschenden Typ ST398, in dem er sehr häufig resistent gegen Ciprofloxacin ist und seltener als der ST398 resistenten gegen Tetrazyklin (etwa 70 %). Die Ursache für das gehäufte Auftreten dieses Typs bei Masthähnchen ist nicht klar. *S. aureus* dieses Typs wurden als MRSA und als MSSA auch – wenn auch nur vereinzelt – bei Schweinen nachgewiesen. Die retrospektive Untersuchung von *S. aureus*-Isolaten vom Schwein ergab, dass MRSA vom MLST-Typ ST398 mit den *spa*-Typen t011 und t034 und den *SCCmec*-Typen III und V in Deutschland seit mindestens 2004 vorkommen.

Hinsichtlich seiner Pathogenitätseigenschaften weist der MRSA vom Typ ST398 eine sehr geringe Ausstattung mit Pathogenitätsfaktoren auf. Dies gilt sowohl für die Enterotoxine als auch für das Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST), das Panton-Valentine Leukozidin als auch für andere Toxine.

Im Rahmen der vorgelegten Untersuchungen wurde das qualitative Nachweisverfahren für MRSA in Lebensmitteln evaluiert und insbesondere hinsichtlich des Kosten-Nutzen-Verhältnisses optimiert.

Zudem wurden Methoden zur Quantifizierung von MRSA in und auf Lebensmitteln bzw. Schlachtkörpern entwickelt und erprobt. Es konnte gezeigt werden, dass Verfahren, die für Koagulase positive Staphylokokken etabliert sind, auch auf MRSA anwendbar sind. Es konnte auch gezeigt werden, dass Probenahmemethoden, die für andere Erreger auf Schlachtkörperoberflächen etabliert sind, auch für die Probenahme auf MRSA nutzbar sind. Dabei ist bei erwarteter geringer Belastung der Beprobung einer größeren Fläche durch die Kratzschwammethode der Vorzug gegenüber der destruktiven Untersuchung mit der Hautstanze zu geben. Bei höherer Belastung sind die Methoden als gleichwertig anzusehen.

Untersuchungen an experimentell kontaminiertem Hackfleisch konnten zeigen, dass MRSA, die die Fähigkeit zur Toxinbildung besitzen, sich in Hackfleisch vermehren können und auch Enterotoxin bilden. Allerdings sind nach bisherigen Erfahrungen solche Stämme unter den ST398 selten und die experimentellen Untersuchungen wurden mit einem MRSA vom Typ t032 durchgeführt, der dem humanen MRSA ST22 zuzuordnen ist.

6. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Im Hinblick auf die Typisierung der Isolate konnten die meisten der im Rahmen des Projektes anvisierten Ziele erreicht werden.

6.1. Prüfung der Übertragung von MRSA zwischen verschiedenen Tierarten in der Primärproduktion

Diese Fragestellung konnte in der Untersuchung in einem Milchviehbestand in Baden-Württemberg gezielt adressiert werden. Es konnte dort gezeigt werden, dass Isolate der selben Subtypen sowohl in den Schweinebeständen als auch in der Milchviehherde und bei Mitarbeitern nachweisbar waren. Dies unterstreicht die Möglichkeit einer Übertragung von MRSA von Tieren auf andere Tierarten und auf den Menschen.

Weiterhin deutet das Vorkommen des *spa*-Typs t1430 bei Schweinen und bei Hähnchen darauf hin, dass der Stamm grundsätzlich bei beiden Tierarten vorkommen kann, mithin eine Übertragung auch möglich ist. Derselbe *spa*-Typ zeigt aber auch, dass es offenbar Schwerpunkte spezifischer Stämme bei spezifischen Tierarten gibt. Dies macht weitere Untersuchungen zur Wirtsspezifität sowohl von Stämmen des MLST-Typs ST398 als auch von Stämmen des MLST-Typen ST9 erforderlich.

6.2. Prüfung der Übertragung von MRSA von kolonisierten Tieren auf das Lebensmittel im Rahmen der Lebensmittelgewinnung (Schlachtung, Milchgewinnung)

Diese Fragestellung wurde bearbeitet. Es zeigte sich, dass die im post-harvest Bereich vorkommenden MRSA überwiegend denselben Typen zugeordnet werden können, wie in der Primärproduktion. Es zeigte sich aber auch, dass bei sorgfältiger Schlacht- und Verarbeitungshygiene ein hoher Anteil positiver Schlachtschweine nicht unbedingt zu einem hohen Anteil positiver Lebensmittel führen muss. Andererseits zeigen die ersten Ergebnisse der Untersuchungen nach dem Zoonosen-Stichprobenplan 2009, dass in einigen Lebensmitteln mit hohen Anteilen kontaminierter Lebensmittel zu rechnen ist. Die Ursachen hierfür bedürfen weiterer, vor allem vertikaler Untersuchungen entlang der verschiedenen Lebensmittelketten.

6.3. Prüfung des Eintrags von MRSA in die Lebensmittelkette aus potentiellen anderen Quellen (Nachweis von MRSA anderer Typen, die in der Primärproduktion nicht nachgewiesen wurden)

Zu dieser Frage konnten eindeutige Ergebnisse erzielt werden: Es werden zwar überwiegend MRSA im Lebensmittel gefunden, die auch in der Primärproduktion bei den Nutztieren vorkommen. Allerdings werden auch solche Stämme gefunden, von denen bekannt ist, dass sie in der Bevölkerung weit verbreitet sind, in Nutztierbeständen aber selten bis gar nicht vorkommen (z.B. ST5, t002).

6.4. Prüfung einer möglichen Selektion spezifischer MRSA durch die Prozessschritte in der Lebensmittelbe- und -verarbeitung

Die Frage der Selektion spezifischer Stämme durch die Prozessschritte konnte nicht eindeutig beantwortet werden. Zwar kam es in der untersuchten Prozesskette zur Elimination der bei den Schlachttieren beobachteten selteneren MRSA-Typen (Beneke et al. 2009). Allerdings war die Belastung mit MRSA im post-harvest-Bereich insgesamt geringer, so dass nicht auszuschließen ist, dass die Elimination der drei spezifischen *spa*-Typen ein zufälliger Effekt ist. Die insgesamt im Lebensmittel nachzuweisende breite Palette von MRSA spricht eher gegen eine selektive Elimination bestimmter Typen. Hier sind weitere Untersuchungen an einem umfangreicheren Probengut erforderlich. Diese sollten durch experimentelle Arbeiten zum Überleben bestimmter MRSA-Typen auf der Oberfläche von Schlachtkörpern und in den Lebensmitteln Milch und Fleisch ergänzt werden. Für solche Untersuchungen wurden mit der Etablierung der Quantifizierungsmethoden (wissenschaftliches Ziel 1) die Voraussetzungen geschaffen.

6.5. Prüfung der Verwandtschaft der von Tieren und Lebensmitteln isolierten MRSA mit Stämmen, die von Menschen isoliert werden

Zu dieser Frage gibt es aus den eigenen Untersuchungen Hinweise. Die Untersuchung von humanen MRSA Isolaten gehört nicht zu den originären Aufgabenbereichen des BfR. In Kooperation mit Einrichtungen des Landesgesundheitsdienstes Baden-Württemberg konnte jedoch gezeigt werden, dass zumindest in dem untersuchten Milchviehbetrieb bei Mitarbeitern und den Milchkühen sowie im Staub identische MRSA-Stämme nachweisbar waren.

7. Literaturverzeichnis

- Anderson, M. E., und J. S. Weese. 2007. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swabs in horses. *Vet Microbiol* 122(1-2):185-189.
- Argudin, M. A., A. Fetsch, B.-A. Tenhagen et al. 2009a. Virulence and Resistance Determinants in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 Isolates. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Helsinki, Finland, 2009a.
- Argudin, M. A., A. Fetsch, B. A. Tenhagen et al. 2009b. High heterogeneity within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates defined by Cfr9I macrorestriction-PFGE profiles, spa- and SCCmec-types. *Appl Environ Microbiol*:in press.
- Argudin, M. A., M. R. Rodicio, und B. Guerra. 2010. The emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 clone can easily be typed using the Cfr9I Smal-neoschizomer. *Lett Appl Microbiol* 50(1):127-130.
- Beneke, B., S. Klees, A. Fetsch et al. 2009. Erhebungen zum Vorkommen von Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* bei der Herstellung von Frischfleisch und Frischfleischzubereitungen vom Schwein. Garmisch-Partenkirchen, 30.09.2009, Tagung der DVG Fachgruppe Lebensmittelhygiene, in press.
- Bens, C. C., A. Voss, und C. H. Klaassen. 2006. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Clin Microbiol* 44(5):1875-1876.
- CLSI. 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Ninth Edition, M02 - A9, Volume 26. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- de Boer, E., J. T. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit et al. 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology* 134:52-56.
- de Neeling, A. J., M. J. van den Broek, E. C. Spalburg et al. 2007. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology* 120(3-4):366-372.
- EFSA. 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part A: MRSA prevalence estimates; on request from the European Commission. *The EFSA Journal* 2009(7(11)):82pp.
- Enright, M. C., N. P. Day, C. E. Davies et al. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 38(3):1008-1015.
- Fetsch, A., B.-A. Tenhagen, B. Guerra et al. 2009a. Potential emergence of a non ST398 clone in livestock animals and food. 3rd Symposium on Antimicrobial Resis-

- tance in Animals and the Environment. Tours, FR, 01.06.2009a, Proceedings, P40.
- Fetsch, A., B.-A. Tenhagen, B. Kraushaar et al. 2009b. Diversität der laMRSA in der Lebensmittelkette. BfR Symposium Zoonosen und Lebensmittelsicherheit. Berlin, 2009b, Tagungsband, 103-106.
- Goto, M., H. Takahashi, Y. Segawa et al. 2007. Real-time PCR method for quantification of *Staphylococcus aureus* in milk. *J Food Prot* 70(1):90-96.
- Graveland, H., E. van Duijkeren, A. van Nes et al. 2009. Evaluation of isolation procedures and chromogenic agar media for the detection of MRSA in nasal swabs from pigs and veal calves
2. *Vet Microbiol.*
- Graveland, H., J. Wagenaar, M. Broekhuizen-Stins et al. 2008. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veal calf farmers and veal calves in the Netherlands. ASM conference: Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria and foodborne pathogens. Copenhagen, Dk, 15.06.2008, in: National Food Institute, ed.: Proceedings, National Food Institute, Copenhagen, Denmark, 62-63.
- Hasman, H., A. Moodley, L. Guardabassi et al. 2009. spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Vet Microbiol.*
- Hein, I., H. J. Jorgensen, S. Loncarevic et al. 2005. Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. *Res Microbiol* 156(4):554-563.
- Hein, I., A. Lehner, P. Rieck et al. 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl Environ Microbiol* 67(7):3122-3126.
- Huletsky, A., R. Giroux, V. Rossbach et al. 2004. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol* 42(5):1875-1884.
- Meemken, D., T. Blaha, R. Tegeler et al. 2009. Livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (laMRSA) isolated from lesions of pigs at necropsy in Northwest Germany between 2004 and 2008. *Zoonoses and Public Health*:in press.
- Mevius, D., C. Dierikx, D. Verheijen et al. 2008. Resistance and virulence determinants in MRSA strains isolated in 2007 from pigs, veal calves, and food products in The Netherlands. Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria and foodborne pathogens. Copenhagen, DK, 15.06.2008-18.06.2008, Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria and foodborne pathogens.
- Mulders, M. N., A. Haenen, P. L. Geenen et al. 2009. Prevalence of MRSA in Dutch Broiler slaughterhouses. ASM conferences: Methicillin-resistant staphylococci in animals: Veterinary and public health implications. London, UK, 22.09.2009-25.09.2009, in: ASM and ESCMID, eds.: Proceedings, London, 20.

- Persoons, D., S. Van Hoorebeke, K. Hermans et al. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry. *Emerg. Infect Dis* 15(3):452-453.
- Shopsin, B., M. Gomez, S. O. Montgomery et al. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 37(11):3556-3563.
- Spescha, C., R. Stephan, und C. Zweifel. 2006. Microbiological contamination of pig carcasses at different stages of slaughter in two European Union-approved abattoirs. *J Food Prot* 69(11):2568-2575.
- Tenhagen, B.-A., K. Alt, A. Fetsch et al. 2009a. Typing results of MRSA on different pig production levels. ASM conference on methicillin-resistant staphylococci in animals - veterinary and public health implications. 22.09.2009a, Proceedings, London, 53.
- Tenhagen, B.-A., A. Fetsch, K. Alt et al. 2009b. MRSA in herds of fattening pigs in Germany - Associated risk factors. Safe Pork 2009 - 8th international symposium on epidemiology and control of foodborne pathogens in pork. Quebec, Canada, 30.09.2009b, Proceedings, Quebec, Kanada, 124-127.
- Tenhagen, B.-A., A. Fetsch, B. Stührenberg et al. 2009c. Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. *The Veterinary Record* 165:589-593.
- Van den Eede A., A. Martens, U. Lipinska et al. 2009. High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Veterinary Microbiology* 133:138-144.
- Vicca, J., W. Vanderhaeghen, T. Cerpentier, and P. Butaye. 2008. Prevalence at herd-level of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in milk samples of dairy herds. 71-75 in *Mastitis control from science to practice*. T. J. G. M. Lam, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Voedsel en Warenautoriteit. 2008. MRSA bacteria on meat, http://www.vwa.nl/portal/page?_pageid=119,1639824&_dad=portal&_schema=PORTAL&p_news_item_id=23121. Accessed 7-3-2008.
- Wagenaar, J. und A.W. van de Giessen. 2009. RIVM-rapport: Veegerelateerde MRSA: epidemiologie in dierlijke productieketens, transmissie naar de mens en karakterisatie von de kloon. de Bilt, NL, 13.12.2009
- Zhang, K., J. A. McClure, S. Elsayed et al. 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 43(10):5026-5033.