

Abschlussbericht
zum Teilprojekt 2808HS019 aus dem Verbundvorhaben
MRSA-Problematik in der Nutztierhaltung.

Titel:

**Optimierung des Probenahmeverfahrens zum Nachweis von
MRSA in Tierbeständen**



Schulz, J. und Hartung, J.

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

Berichts- und Projektzeitraum 01.12.2009 – 31.03.2012

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	3
1.1	Planung und Ablauf des Vorhabens	4
1.2	Stand der Wissenschaft zum Projektstart	7
2.	Material und Methoden	11
2.1	Nutztierbestände	11
2.2	Probenahmeverfahren und Laboranalysen	11
2.3	Statistik	13
3.	Ergebnisse	14
3.1	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	14
3.1.1	Befunde aus Schweinebeständen	14
3.1.1.1	Sensitivität von verschiedenen Probenahmeverfahren in Mast- und Zuchtbeständen	14
3.1.1.2	Untersuchungen zur MRSA Belastung der Tierumgebung und zum Anteil positiver Proben vom Tier in Mast- und Zuchtbetrieben	21
3.1.1.3	Probenahme in negativen Schweinebeständen	25
3.1.2	Befunde aus Geflügelmastbeständen	27
3.1.3	Befunde aus Milchviehbeständen	31
3.2	Diskussion der Ergebnisse	32
3.2.1	Untersuchungen in Mast- und Zuchtschweinebeständen	32
3.2.2	Untersuchungen in Geflügelmastbeständen	36
3.2.3	Untersuchungen in Milchviehbeständen	37
4.	Zusammenfassung	38
5.	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen	40
6.	Literaturverzeichnis	41

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Aus vorliegenden Untersuchungen ist bekannt, dass MRSA bei unterschiedlichen Nutztierarten an verschiedenen Lokalisationen des Tierkörpers sowie in der Tierumgebung häufig vorkommt. Unklar ist bislang die Sensitivität der benutzten Nachweisverfahren und inwieweit die gleichen Probenahmeverfahren bei verschiedenen Tierarten und in unterschiedlichen Haltungsformen eingesetzt werden können. Ziel dieses Teilprojektes ist es daher, im Rahmen der Erfüllung eines Entscheidungshilfebedarfs des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) geeignete Probenahme- und Nachweisverfahren für MRSA (Methicillin resistente *Staphylococcus aureus*) zu entwickeln, mit denen der MRSA Status in Nutztierbeständen festgestellt werden kann und diese Verfahren auf Effizienz und Standardisierbarkeit zu prüfen. Die Verfahren sollen auch dazu geeignet sein, die Wirksamkeit von Reinigungsverfahren und Desinfektionsmaßnahmen in Tierbeständen festzustellen. Die Ergebnisse des Vorhabens sollen in die Grundlagen der deutschen Rechtssetzung für die Überwachung von Tierbeständen hinsichtlich des Auftretens von MRSA eingehen und auf gemeinschaftlicher Ebene zur Ausgestaltung des Zoonosemonitoring gemäß Richtlinie 2003/99/EG dienen.

Im Einzelnen werden dazu

- Probenahme- und Nachweisverfahren entwickelt und geprüft, die einen effizienten und standardisierbaren Nachweis von MRSA in Tierbeständen der Tierarten Schwein, Huhn und Rind gewährleisten sollen. Die Verfahren werden hinsichtlich ihrer „Sensitivität“ für den MRSA Nachweis verglichen und bewertet.
- Verfahren im Hinblick auf eine mögliche Erreger-Quantifizierung (Keimzahlen) in Beziehung zu den verschiedenen Kompartimenten (z.B. am Tier, im Stallstaub) in Zusammenarbeit mit dem Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Staphylokokken des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) geprüft bzw. optimiert.

- der Einfluss des Erregernachweises (qualitativ und quantitativ) in Umgebungs- und Tierproben auf den Anteil und die Verteilung MRSA positiver Tiere in einem Bestand untersucht.
- etwaige Einflüsse auf das Vorkommen unterschiedlicher MRSA Stämme in einem Bestand unter Einbeziehung des NRZ für Staphylokokken untersucht.
- aus logistischen und Kostengründen überwiegend Untersuchungen in Beständen durchgeführt, die in den Teilprojekten 020, 029, 030 und 041 beprobt werden.

Im Zuge der Aufgabenbearbeitung sollen außerdem folgende Hypothesen geprüft werden:

- Das Vorkommen von MRSA aus Staubproben kann mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden.
- Im Kompartiment Nase kann MRSA am Häufigsten nachgewiesen werden.
- Der Anteil und die Verteilung MRSA positiver Tiere im Bestand schwanken in Abhängigkeit unterschiedlicher Einflussfaktoren (z.B. Haltungssystem, Management, Nachweishäufigkeiten in Tierumgebungsproben).

Für die Datenerhebung werden im Projekt in Zusammenarbeit mit dem BfR standardisierte Probenahmeprotokolle erstellt. Die erhobenen Daten werden in geeigneter Weise als Rohdatensatz für die statistische Auswertung und Nutzung im Rahmen von Risikomodellierungen in einer Datenbank angelegt.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Teilprojekt 2808HS019 (TP19) „Optimierung des Probenahmeverfahrens zum Nachweis von MRSA in Tierbeständen“ ist zentrales Teilvorhaben im Verbund, in dem eigene Daten erhoben werden und dem Daten aus den Teilprojekten 2808HS020 (TP20, Probenahme in Zucht- und Ferkelerzeugerbetrieben), 2808HS030 (TP30, Probenahme bei Mastschweinen), 2808HS029 (TP29, Probenahme in Schweine-, Mastgeflügel- und Rinderbeständen) und 2808HS041 (TP41, Probenahme in Schweine-, Mastgeflügel- und Rinderbeständen) für die Aufgabenbearbeitung zur Verfügung gestellt werden.

Die folgend aufgeführte **Tabelle 1** gibt einen Überblick über die Anzahl der verschiedenen Tierbestände und die Anzahl der Bestandsbeprobungen im Gesamtvorhaben, die als Datengrundlage für die im Rahmen dieses Teilvorhabens durchzuführenden Auswertungen vorgesehen waren.

Tabelle 1: Anzahl der vorgesehen Bestandsbeprobungen zur Datenauswertung in TP19.

Teilprojekt	Anzahl Tierbestände	Anzahl Bestandsbeprobungen (n)
2808HS019	4 MRSA negative Schweinebestände 4 Milchviehbestände (3 MRSA positive und ein negativer Bestand)	3 pro Bestand (12) 4 pro Bestand (16)
2808HS020	12 Zuchtschweinebestände	10 pro Bestand (120)
2808HS029	9 Schweinebestände 3 Schweinebestände 3 Kälbermastbetriebe 2 Geflügelmastbetriebe 3 Geflügelmastbetriebe	eine pro Bestand (9) 4 pro Bestand (12) eine pro Bestand (3) eine pro Bestand (2) 4 pro Bestand (12)
2808HS030	16 Mastschweinebestände	8 pro Bestand (128)
2808HS041	8 Schweinebestände 3 Schweinebestände 2 Geflügelmastbetriebe 3 Geflügelmastbetriebe	eine pro Bestand (8) 4 pro Bestand (12) eine pro Bestand (2) 4 pro Bestand (12)

Die Aufgabe des Institutes für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie bestand zunächst in der Entwicklung von quantitativen Probenahmeverfahren zur Untersuchung der Tiere und ihrer Umgebung. Darüber hinaus wurden neben der Durchführung eigener Bestandsuntersuchungen Daten für die spätere Auswertung aus den verschiedenen Teilprojekten akquiriert. Die Daten sollten für die unter Abschnitt 1 genannten Aufgaben entsprechend aufbereitet werden und ersten statistischen Analysen unterzogen werden. Gleichzeitig sollten die Daten in geeigneter Weise als Rohdatensatz für die weitere Nutzung, z.B. für Risikomodellierungen durch das BfR, zur Verfügung gestellt werden.

Zunächst wurden im Vorfeld der größeren Feldstudien die qualitative und quantitative Aufbereitung von Socken- und Tiertupfern getestet. Dazu wurden Proben in MRSA positiven Schweinebeständen genommen und im Labor qualitativ und quantitativ untersucht. Anhand dieser Untersuchungen wurden beispielsweise die Aufarbeitungen von Tier- und Sockentupfern eigens für die weiterführenden Studien entwickelt. In Zusammenarbeit mit dem ITU an der FU-Berlin entstanden somit Probenahme- und Analysenprotokolle, die für die weiteren Untersuchungen im Projekt von allen Projektpartnern verwendet wurden. Die Protokolle sind mit den Zwischenberichten bereits beschrieben worden.

Im Rahmen des TP19 wurden fünf Schweinebestände je vier mal beprobt, die einen augenscheinlich hohen Hygienestandard gefahren haben. Es handelte sich um Bestände von vier Ferkel erzeugenden Betrieben und von einem Mastbetrieb, die bei der Erstbeprobung in allen Proben MRSA negativ waren. Die Bestände wurden innerhalb von 3 bis 12 Monaten vier- bis fünfmal beprobt, um mögliche Veränderungen des MRSA Status beobachten zu können.

Des Weiteren wurden innerhalb des TP19 vier Milchviehbetriebe beprobt. Ein „Vorscreening“ (vier Betriebe einmal beprobt) und die Anfrage in Baden Württemberg positive Bestände beproben zu dürfen, verblieben erfolglos. Daher wurden 2 Bestände mit unbekanntem Status viermal beprobt, ein dritter Bestand und ein vierter Bestand mit Nähe zu MRSA positiven Schweinebeständen konnten jeweils einmalig beprobt werden. Somit wurden 10 von 16 geplanten Bestandsuntersuchungen (siehe Tabelle 1) in Milchviehbetrieben durchgeführt. Wird das „Vorscreening“ berücksichtigt, wurden 14 Bestandsuntersuchungen auf Milchviehbetrieben absolviert. Insgesamt wurden im TP19 dann 34 Bestandsuntersuchungen in Milchviehbeständen und Schweinebeständen vorgenommen, d.h. die Anzahl der Bestandsbeprobungen lag zwei über dem Soll.

Aus den Teilprojekten TP20 und TP30 wurden gemäß der Aufstellung in Tabelle 1 Daten aus 28 Schweinebeständen geliefert. Die Daten wurden in geeigneter Weise (Excel Datenblätter) elektronisch an das ITTN zur Auswertung gesendet. In den Teilprojekten Emissionen (TP29 und TP41) wurden in der Quer- und Langzeitstudie ebenfalls 28 verschiedene Schweinebestände beprobt. Je ein Zucht- und ein Mastbestand aus der

Querschnittstudie des TP029 wurden in den Studien der Teilprojekte TP20 und TP30 mit aufgenommen, so dass insgesamt 54 Datensätze aus verschiedenen Beständen der Teilprojekte TP20, TP29, TP30 und TP41 vorlagen. Drei Bestände aus dem TP19 wurden auch im Rahmen von TP41 untersucht. Das bedeutet, dass aus allen Teilprojekten insgesamt Daten in 56 verschiedenen Beständen aufgenommen wurden. Die Parallelbeprobung von einzelnen Beständen war aufgrund der verschiedenen Fragestellungen in den Teilprojekten vertretbar. Die Gesamtzahl der geplanten Bestandsbeprobungen bei Zucht- und Mastschweinen wurde im Ganzen betrachtet übererfüllt. Das gleiche gilt für die Datenerhebungen in Geflügelmastbetrieben. Weil der MRSA Status in Geflügelbeständen wechseln kann, waren mehr Bestandsbeprobungen als vorgesehen notwendig. Anstelle von 28 wurden Ergebnisse aus 38 Bestandsuntersuchungen von 13 verschiedenen Betrieben übermittelt.

Keine verwertbaren Daten liegen aus exemplarischen Einzeluntersuchungen in drei Kälbermastbetrieben vor. Bezogen auf die Gesamtzahl der geplanten Bestandsuntersuchungen wurden dennoch mehr Untersuchungen als geplant durchgeführt. Die Übermittlung der Ergebnisse aus den verschiedenen Teilvorhaben für die Datenanalyse im ITTN wurde mit großer Sorgfalt von allen Verbundpartnern und vom Unterauftragnehmer „Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Ostwestfalen-Lippe (CVUA)“ durchgeführt. Sämtliche Daten wurden vom ITTN für die Auswertungen und statistischen Erhebungen aufbereitet.

1.2 Stand der Wissenschaft zum Projektstart

Staphylococcus aureus, einschließlich der Methicillin resistenten Stämme (MRSA), ist in der Regel ein unauffälliger Besiedler von Haut, Nasen-, Mund- und Rachenraum von Tieren, Nutz- und Begleittieren, und gesunden Menschen. Nur unter bestimmten Bedingungen wie nach Hautverletzungen oder Eintritt in Wunden kann es im Einzelfall zu Wundinfektionen, Abszessen oder auch zu Erkrankungen wie Pneumonie, Meningitis, Endocarditis oder Septikämie kommen (Kloos et al. 1992; Landolo 2000). Von solchen Infektionen ist in den letzten zwei Jahrzehnten weltweit besonders aus Krankenhäusern berichtet worden (Wenzel et al. 1991; Kipp et al. 2004). Die aus den betroffenen Patienten und ihrer unmittelbaren Umgebung isolierten *Staphylococcus aureus* Stämme

wiesen i.d.R. eine hohe Resistenz gegenüber den meisten in Krankenhäusern eingesetzten Antibiotika, insbesondere gegenüber Beta-Lactam Antibiotika und Methicillin auf. Aber auch außerhalb von Krankenhäusern wird in letzten Jahren vermehrt bei Teilen der Bevölkerung über Antibiotika resistente *Staphylococcus aureus* Stämme (community acquired–MRSA) berichtet, die nicht mit denen in den Hospitälern identisch sind und die auch nicht auf eine Übertragung oder Infektion aus diesem Bereich zurückzuführen sind (Kipp et al. 2004, Gonzalez et al. 2006; Klevens et al. 2006).

Daneben wird von so genannten „animal associated“ MRSA Stämmen gesprochen, die sowohl bei Nutz- als auch bei Liebhabertieren gefunden werden (de Neeling et al. 2007; Lee 2006; Weese und Rousseau 2005), wobei hinsichtlich der Klone dieser Stämme durchaus erhebliche Unterschiede bestehen können. Ein spezifischer Klon mit der Bezeichnung ST398, der den CA–MRSA zugeordnet wird, ist in den letzten Jahren vermehrt bei Nutztieren in einer Reihe von Ländern, so auch in Deutschland, nachgewiesen worden und hat offenbar insbesondere in der Schweinehaltung weite Verbreitung (Meemken et al. 2008), von wo er auf andere Tiere und auf den Menschen übergehen und Infektionen hervorrufen kann (Witte et al. 2007; Wulf et al. 2008a). Als Träger und Überträger können dabei Nutztiere und Pferde, Hunde, Katzen und weitere Tiere sowie z.B. tierärztliche Praxen fungieren (e.g. Cuny et al. 2006). Inwieweit Risiken für den Menschen durch Verzehr von mit MRSA kontaminierten Lebensmitteln tierischer Herkunft wie Milch und Fleisch bestehen, ist noch umstritten (VWA 2007, Pu et al. 2008, Moon et al. 2007).

Bekannt ist, dass MRSA von Tieren auf den Menschen übergehen können und Menschen mit direktem Kontakt zu Tieren wie Landwirte (Tierhalter), Halter von Haus- und Liebhabertieren, Tierärzte und Personal in Schlachtbetrieben einen deutlich höheren Kolonisierungsgrad als nicht auf diese Weise exponierte Personengruppen aufweisen (Khanna et al. 2008; Meemken et al. 2008; Wulf et al. 2008a; Wulf et al. 2008b). Am wahrscheinlichsten sind der direkte Tierkontakt, der indirekte Kontakt über kontaminierte Oberflächen, Gegenstände, belebte Vektoren wie z.B. Arthropoden oder über die Luft, Futtermittel und besonders Staub (Förster et al. 2007; Shiomori et al. 2001. Im Stallstaub von Schweineställen sind MRSA, einschließlich ST398, erst kürzlich in erheblichen Mengen nachgewiesen worden (Van den Broek et al. 2008). Wie die Übertragung *in*

praxi stattfindet und durch welche Faktoren diese gefördert oder reduziert wird, ist im Bereich der Nutztierhaltung noch weitgehend unklar (Meemken et al. 2008). Dies hängt u.a. auch wesentlich damit zusammen, dass die Probenahmetechniken für MRSA noch unzureichend standardisiert und in ihrer Effizienz geprüft sind. Neben der Beprobung der Tiere durch Tupfer werden zwar auch für die Tierumgebung eine Reihe von Sammelverfahren vorgeschlagen die bereits erfolgreich in der Humanmedizin eingesetzt werden (Weese 2007; Asoh et al. 2005; Shiomori et al. 2001), jedoch ist unklar, ob diese Verfahren noch eine genügende Sensitivität in der hoch mit Stäuben und Mikroorganismen belasteten Umwelt der Tiere besitzen. Bislang wird von der EFSA lediglich das Betupfen von Oberflächen in Buchten von Schweineställen empfohlen. Ein solches Vorgehen ist jedoch für Haltungssysteme mit anderen Tierarten weder spezifiziert noch standardisierbar und erlaubt allenfalls eine semiquantitative Einschätzung der Flächenkontamination. Ähnliches trifft auf die Beprobung der Tiere von der Oberfläche der Nasenschleimhaut oder der Analfalte zu. Abgesehen von der Belastung der Tiere durch die Fixierung bei den Probenahmen hängt die Quantität der gesammelten MRSA sehr stark von der Besiedlung der gerade getroffenen kleinen Fläche in Nase oder an Anus ab. Es muss daher stets eine repräsentative Anzahl von Tieren mit dem damit verbundenen relativ hohen Aufwand beprobt werden. Eine gezielte Staubsammlung mit Luftvolumen bezogenen Verfahren (Filtration) oder über standardisierte Staubsedimentation nach Zeit und Fläche könnten hier Verbesserungen erbringen. Solche standardisierten Verfahren sind auch wichtige Voraussetzung zur Prüfung der Wirksamkeit von Bekämpfungsmaßnahmen. So könnten mit solchen einfachen und sich als effizient erwiesenen Beprobungs- und Analysestrategien MRSA positive Betrieb und Herden rasch identifiziert und die Wirksamkeit beispielsweise von Maßnahmen zur Unterbrechung der Transmission und Reduzierung von Vektoren geprüft und die bestehenden Hygieneregeln, einschließlich der Reinigungs- und Desinfektionsregime, verbessert werden.

Es ist daher notwendig zu prüfen, inwieweit durch indirekte Beprobungen von z.B. Stallstaub und Stallluft im Bestand ähnlich sichere Befunde wie bei der direkten Beprobung der Tiere erzielbar sind. Allerdings gibt es für die Probenahme von MRSA aus Stallluft und in der Stallumwelt noch kein anerkanntes und validiertes Verfahren.

Auch oben genannte von der EFSA angeregte Staubsammlung von Stalloberflächen erscheint wenig systematisch und vergleichbar zwischen verschiedenen Ställen. Vermutlich dürften sich für MRSA grundsätzlich die auch sonst für Staphylokokken üblicherweise benutzten Methoden und Verfahren eignen. Vergleichende systematische Untersuchungen liegen dazu aber nicht vor. So ist es denkbar, den Sedimentationsstaub im Stall auf beim Einsetzen zunächst sterilen definierten Oberflächen zu sammeln, womit ein Flächen- und Zeitbezug gegeben ist. Dieses definierte Vorgehen wurde in der Vergangenheit erfolgreich zur quantitativen Sammlung von Sedimentationsstaub sowohl in Schweineställen (Adrian und Hilliger 1988; Hartung 1989) als auch in der Geflügelhaltung (Saleh 2006) angewandt. Mit der Sedimentationsmethode werden allerdings nur die tatsächlich sedimentierenden Keime erfasst. Außerdem kann kein Volumenbezug (KBE/m³) hergestellt werden. Dies ist mit Methoden wie der Filtration und dem Impingement, die im Teilprojekt 2808HS029 zum Einsatz kommen, deutlich besser möglich. Welches das effektivere Verfahren zum Nachweis von MRSA darstellt, kann derzeit noch nicht abgeschätzt werden, weshalb ein Methodenvergleich angebracht erscheint. Dieser sollte sich auch auf die Partikelabscheidecharakteristik, die maximalen Sammelzeiten und den Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der luftgetragenen MRSA beziehen. Ansätze beim Impinger, wie z. B. der Einsatz von schonenden Pufferzusätzen oder bei der Filtration durch gezielte Eluierung mit Anreicherungsmedien wurden bereits erarbeitet (Thorne et al. 1992; Schulz 2007). Eine Standardisierung der Staubsammel- und Luftprobenahmetechnik für MRSA würde nicht nur die Tiere entlasten sondern auch helfen, Befunde aus Feldmessungen besser miteinander vergleichen zu können.

Es wird daher vorgeschlagen, die derzeit benutzten Probenahme und Analyseverfahren mit alternativen Verfahren in einer praxisgetragenen Erhebung zu vergleichen und einzuschätzen. Dabei steht die Entwicklung und Beschreibung eines effizienten Probenahmeverfahrens für MRSA sowohl am Tier als auch aus der Tierumgebung im Vordergrund. Dazu wird eine breite horizontale Kooperationspartnerschaft mit mehreren Regionen in Deutschland etabliert. Im Folgenden wird ein aussichtsreiches Vorgehen vorgeschlagen, das neben der reinen Prävalenzaufnahme methodische Akzente zur Standardisierung der Probenahme von MRSA in der Nutztierhaltung setzt, und dass mit Hilfe von horizontalen sowie longitudinalen Erhebungen die Praxiseignung der Methoden

in Herden und Betrieben erweisen soll. Die Durchführung erfolgt im Rahmen dieses Verbundvorhabens durch das Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie als Koordinator und in enger Zusammenarbeit mit den unten genannten Vertragspartnern (Unterauftragsnehmer), die alle bereits hervorragende Expertise auf diesem Gebiet aufweisen.

2. Material und Methoden

2.1 Nutztierbestände

Es wurden insgesamt 56 Schweinebestände (29 Mastschweinebestände, 27 Zuchtschweinebestände), 13 Geflügelmastbestände (7 Mastputenbestände, 6 Masthühnerbestände) und vier Milchviehbestände beprobt. Die Charakteristika der untersuchten Schweinebestände (z.B. Bestandsgröße, Management, Behandlung etc.) wurden anhand von Fragebögen erfasst und in eine zentrale Datenbank (Server in der Außenstelle für Epidemiologie in Bakum) eingegeben. Informationen zum Bestand wurden in ähnlicher Weise auch im Rahmen der Teilprojekte 029 und 041 für Geflügelmastbetriebe eingeholt. Lediglich für die Milchviehbetriebe wurden nur der Standort, die Art der Haltung und die Bestandsgröße erfasst. Für die Auswertungen in diesem Teilvorhaben waren nur grundsätzliche Informationen, wie z.B. die Art des Haltungssystems, notwendig. Auf eine ausführliche Beschreibung der Bestandscharakteristiken wurde daher an dieser Stelle verzichtet. Die Daten können für weitere Betrachtungen, wie z.B. einer späteren Risikomodellierung, von den Projektpartnern zur Verfügung gestellt werden.

2.2 Probenahmeverfahren und Laboranalysen

Die auf den Betrieben eingesetzten Probenahmeverfahren, die anschließende Probenaufarbeitung und die Probenanalysen sind gemäß den Beschreibungen in den vorangegangenen Zwischenberichten durchgeführt worden.

In folgender **Tabelle 2** befindet sich eine Übersicht über die 19 verschiedenen Probenahmeverfahren, die im Verbundprojekt eingesetzt wurden und entsprechend der

Aufgabenstellung in diesem Teilvorhaben hinsichtlich ihrer Eignung und Empfindlichkeit für den MRSA Nachweis validiert werden sollten. Die Sockentupfer- und Sedimentationsstaubproben aus Schweinebeständen wurden vom Auftragnehmer CVUA analysiert. Das CVUA untersuchte im Zeitraum September 2009 bis einschl. November 2010 insgesamt 365 Sockentupferproben und 119 Sedimentationsstaubproben qualitativ und quantitativ. Damit wurden weit mehr Proben als im Projektplan veranschlagt (433 insgesamt) vom Unterauftragnehmer bei Kostenneutralität im Projekt untersucht.

Die Anzahl der verschiedenen Probenahmeverfahren, die am Tag der Bestandsbeprobung in den verschiedenen Beständen eingesetzt wurde, variiert stark, da die Verfahren je nach Fragestellung in den einzelnen Teilprojekten unterschiedlich häufig eingesetzt wurden. Beispielsweise wurden regelmäßig mindestens 10 Verfahren in den Emissionsprojekten (TP20 und TP41) eingesetzt, während in TP20 oder TP30 häufig 5 (minimal 2, maximal 8) Verfahren benutzt wurden.

Tabelle 2: Eingesetzte Probenahmeverfahren im Verbundprojekt und Anzahl untersuchter Tierbestände, in denen die Verfahren eingesetzt wurden.

Probenahmeverfahren	Anzahl untersuchter Schweinebestände	Anzahl untersuchter Geflügelmastbestände	Anzahl untersuchter Rinderbestände
Nasentupfer	56		4
Hauttupfer	28	13	
Vaginaltupfer	9		
Gesäugetupfer	3		
Perianaltupfer	3		
Choanentupfer		13	
Analfaltentupfer			4
Vorgemelkanalyse			4
Sammelgemelkanalyse			4
Sammelstaub	56	13	4
Sedimentationsstaub	32		
Sockentupfer	56	13	4
Sammelkot	32	13	4
Tränkenippeltupfer	6		

Spielzeugtupfer	4		
Futteranalyse	18	13	4
Einstreuanalyse			1
Luft (Impingement Filtration)*	28	13	

* In der Datenanalyse (Ergebnisteil) werden die Luftprobenahmen mit Impingern und Filtern getrennt betrachtet.

2.3 Statistik

Einfache statistische Berechnungen wie Mittelwerte, Standardabweichungen, mediane und deren zugehörige Quartile wurden z.T. direkt in Excel berechnet. Weitergehende statistische Analysen wurden mit dem SAS-Programm 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Signifikante Unterschiede in den MRSA- Nachweishäufigkeiten einzelner Probenahmeverfahren wurden mit der „PROC FREQ“ Prozedur untersucht. Der paarweise Methodenvergleich von McNemar wurde für den direkten Vergleich von jeweils zwei Probenahmeverfahren verwendet. Zusätzlich wird der Kappa-Koeffizient (einschl. des Konfidenzintervalls) angegeben. Dieser Koeffizient ist ein Maß für die Übereinstimmung zweier Beobachtungen. Ein hohes bis sehr hohes Maß an Übereinstimmung wird durch Kappawerte $> 0,61$ ausgedrückt. Mittelmäßige Übereinstimmungen liegen zwischen 0,6 und 0,41, leichte Übereinstimmungen liegen im Bereich 0,40 bis 0,21 und schwache Übereinstimmungen unter 0,2 (Altmann 1991). Korrelationsanalysen wurden mit der „CORR“ Prozedur im SAS System durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Befunde aus Schweinebeständen

3.1.1.1 Sensitivitäten von verschiedenen Probenahmeverfahren in Mast- und Zuchtbeständen

Zum Vergleich der Sensitivität verschiedener Probenahmeverfahren wurden Untersuchungen von 28 Mastbeständen und 24 Zuchtbeständen ausgewertet. Es handelte sich dabei um 28 Bestände aus den Teilprojekten 029 und 041 sowie um 24 Bestände aus den Teilprojekten 020 und 030, die während der Untersuchungen in mindestens einer Probe MRSA positiv getestet wurden und in denen am Tag der Beprobung zwischen drei und zwölf verschiedenen Probenahmeverfahren zum Einsatz kamen. Insgesamt wurden 14 verschiedene Stellen am Tier und in der Tierumgebung beprobt. In den folgenden **Abbildungen 1, 2 und 3** sind zunächst die mit den verschiedenen Probenahmeverfahren am Tier und in der Tierumgebung erzielten relativen Nachweishäufigkeiten auf Bestandesebene dargestellt.

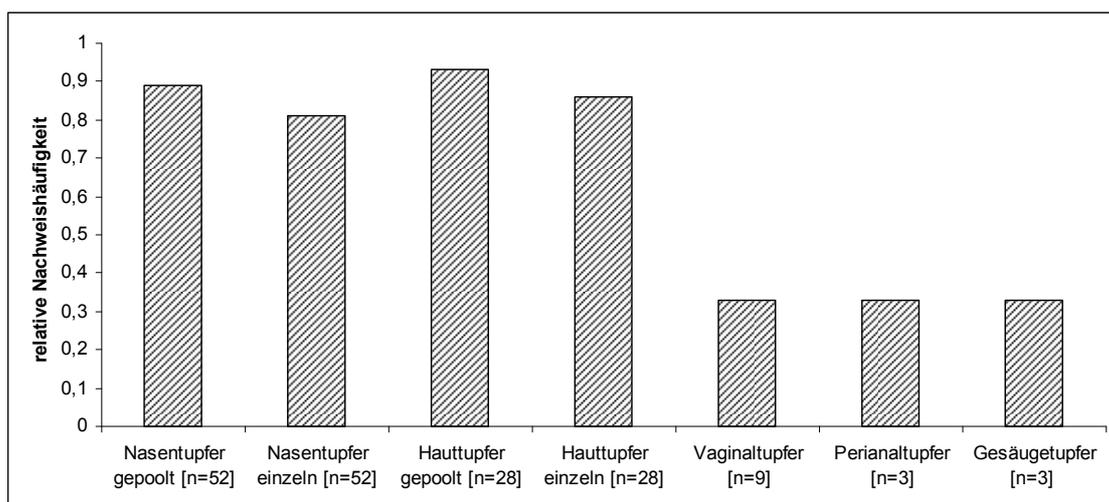


Abb. 1: Sensitivität der Probenahmeverfahren am Tier. n = Gesamtzahl der beprobten Bestände, in denen das Verfahren eingesetzt wurde.

In der **Abbildung 1** wurden die höchsten relativen Nachweishäufigkeiten auf Bestandsebene mit den gepoolten Haut- und Nasentupfern erzielt. Haut- und Nasentupfer einzeln untersucht zeigen etwas geringere Nachweishäufigkeiten, die jedoch deutlich über den weiteren beprobten Körperregionen liegen. Letztere wurden nur in wenigen Beständen untersucht und dienten dem Aufzeigen möglicher MRSA Übertragungswege im Tierbestand, wie z.B. dem möglichen Weg vom Gesäuge des Muttertiers aus zum Ferkel.

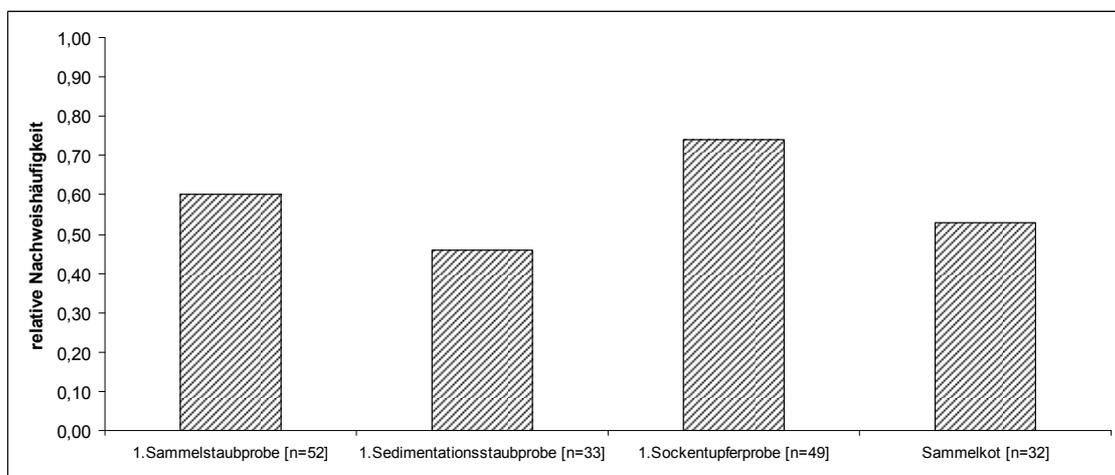


Abb. 2: Sensitivität der Probenahmeverfahren in der Tierumgebung. n = Gesamtzahl der beprobten Bestände, in denen das Verfahren eingesetzt wurde. Die Beprobung der Tierumgebung in Abbildung 2 zeigte gegenüber Haut- und Nasentupfern niedrigere Nachweishäufigkeiten. Die Probenahme mittels Sockentupfer scheint dabei noch die am meisten geeignete Beprobung der Tierumgebung. Der Nachweis in der Luft gelang relativ gesehen genauso häufig wie der im Staub (vgl. Abb. 2 und 3). Andere Nachweishäufigkeiten an Stallstrukturen oder beispielsweise in Füttertrögen lagen niedriger. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass MRSA mit an allen 16 eingesetzten Probenahmeverfahren nachgewiesen werden konnte, was auf sein hohes Verbreitungspotential innerhalb eines Bestandes hinweist.

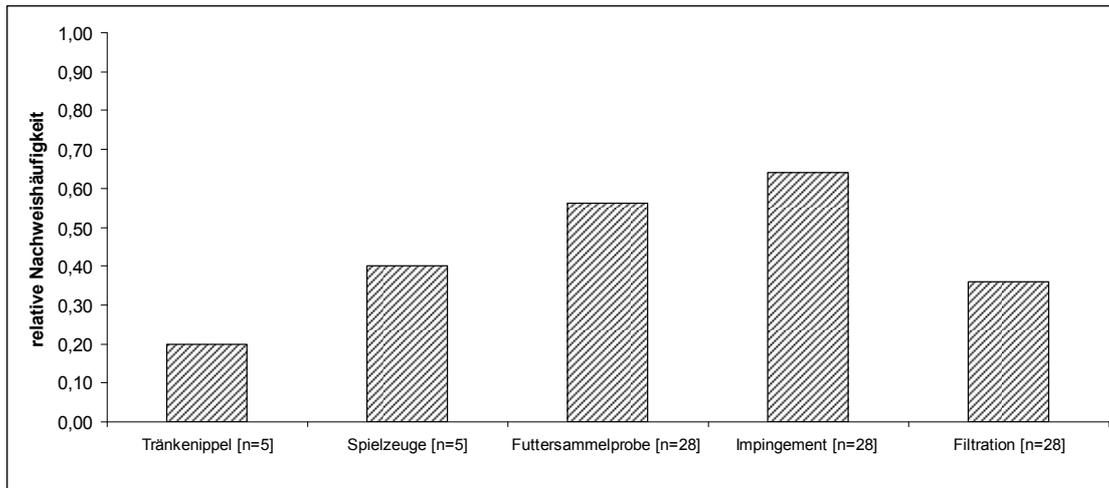


Abb. 3: Sensitivität der Probenahmeverfahren in der Tierumgebung. n = Gesamtzahl der beprobten Bestände, in denen das Verfahren eingesetzt wurde.

Um zu prüfen, inwieweit die Nachweishäufigkeiten der verschiedenen Probenahmeverfahren gegenüber der Staubbeprobung (Referenzverfahren) signifikant verschieden sind, wurde der paarweisen Methodenvergleich nach McNemar durchgeführt (**Tabelle 3**). Es lag bis auf eine Ausnahme der Datensatz zugrunde, der für die deskriptive Darstellung der Nachweishäufigkeiten in den Abbildungen 1, 2 und 3 verwendet wurde. Beim Vergleich Staubsammelprobe versus Sockentupfer konnte auf einen wesentlich größeren Datensatz zurückgegriffen werden, da diese Verfahren regelmäßig auch in allen Langzeitstudien beim Schwein parallel eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse in **Tabelle 3** bestätigen, dass MRSA in Haut- und Nasentupfern signifikant häufiger nachgewiesen werden konnte als im Staub. Der gepoolte Nasentupfer war im direkten Vergleich mit den Staubproben die sensitivste Probenahme, die am Tier durchgeführt wurde. Bei den Umgebungsproben war gegenüber Staub der Sockentupfer das mit Abstand empfindlichste Nachweisverfahren. Die Kappawerte deuten regelmäßig mittlere bis hohe Übereinstimmungen an, wobei der sehr hohe Kappaindex beim Vergleich der Staub- und Impingerproben auffällt. Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Impinger luftgetragenen Staub sammelt, an dem MRSA i.d.R. gebunden vorliegt.

Der direkte Vergleich zwischen der sensitivsten Tier (Nasenpool)- und Tierumgebungsprobe (Sockentupfer) ergab bei einem Vergleich von 47

Bestandsuntersuchungen einen signifikant häufigeren Nachweis ($p = 0,0196$) mittels der Analyse der Nasentupfer in Fünfergruppen von 60 beprobten Tieren. In einem Fall wurde MRSA nur im Sockentupferpaar nachgewiesen, was darauf hindeuten könnte, dass die parallele Anwendung beider Verfahren eine noch höhere Nachweissicherheit erbringen könnte. Fast identische Ergebnisse wurden beim Vergleich von Socken- und Hautpooltupfern ermittelt.

Tabelle 3: Paarweiser Vergleich von Probenahmeverfahren in Schweinebeständen nach McNemar und Berechnung des Kappa-Index.

Anzahl vergleichener Bestandsbeprobungen	Probenahmeverfahren 1	Anzahl pos. Beprobungen mit Verfahren 1	Prozent pos. Beprobungen mit 1	Probenahmeverfahren 2	Anzahl pos. Beprobungen mit Verfahren 2	Prozent pos. Beprobungen mit 2	Kappa	95% untere Grenze VB	95% oberere Grenze VB	P
45	Kot	20	44,44	Staub	32	71,11	0,4057	0,1823	0,6290	0,0013
46	NasenPool	39	84,78	Staub	31	67,39	0,5411	0,2844	0,7979	0,0047
47	NaseEinzeln	38	80,85	Staub	32	68,09	0,6713	0,4393	0,9033	0,0143
40	Futter	14	35,00	Staub	29	72,50	0,3392	0,1012	0,5376	0,5376
45	PoolHaut	38	84,44	Staub	32	71,11	0,6240	0,3644	0,8835	0,0143
43	HautEinzelnA*	38	88,37	Staub	32	74,42	0,5536	0,2572	0,8501	0,0143
45	HautEinzelnD*	37	82,22	Staub	32	71,11	0,6947	0,4545	0,9350	0,0253
43	Luftfilter	21	48,84	Staub	31	72,09	0,5396	0,3177	0,7615	0,0016
43	Impinger	30	69,77	Staub	31	72,09	0,9436	0,8347	1,0000	0,3173
191	Socken	161	84,29	Staub	114	59,69	0,2151	0,0932	0,3370	< 0,001

*Bei den einzeln untersuchten Hauttupfern wurde methodisch zwischen angereicherten (A) Einzeltupfern und direkt (D) ausplattierten Einzeltupfern unterschieden.

Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Haut- und Nasentupfern sind anhand der Nachweishäufigkeiten in **Tabelle 3** nicht erkennbar. In den Teilprojekten Emissionen (TP029 und TP041) wurden diese Verfahren parallel eingesetzt und hier statistisch ausgewertet. In **Tabelle 4** sind die Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 4 : Vergleich der eingesetzten Probenahmeverfahren zur MRSA Detektion auf der Haut und in der Nase von Schweinen mittels paarweisen McNemar Test.

Anzahl Bestände	Probenahmeverfahren (positive)	Kappa	95% lower	95% upper	McNemar (P)
37	<i>Pool Nase (35) vers. Nase einzeln (29)</i>	0,3432	-0,0195	0,7059	0,0143
28	<i>Pool Haut (26) vers. Haut einzeln (24)</i>	0,6316	0,1742	1,000	0,1573
28	<i>Pool Nase (26) vers. Pool Haut (26)</i>	0,4615	-0,1697	1,000	1,000
28	<i>Pool Haut (26) vers. Nase einzeln (24)</i>	0,2632	-0,2431	0,7694	0,3173
28	<i>Pool Nase (26) vers. Haut einzeln (24)</i>	0,6316	0,1742	1,000	0,1573
28	<i>Nase einzeln (24) vers. Haut einzeln (24)</i>	0,7083	0,3280	1,000	1,000

Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den gepoolten Haut- und Nasentupferproben und zwischen den einzeln untersuchten Haut- und Nasentupfern vor. Lediglich der gepoolte Nasentupfer weist eine signifikant höhere Nachweisrate gegenüber dem einzelnen Nasentupfer auf. Die durch den Kappawert nur leichte Übereinstimmung ergibt sich daraus, dass bei einigen Bestandsbeprobungen nur positive Poolproben analysiert wurden, während die Einzeltupferanalysen negativ ausfielen.

Um die Eignung des Probenahmeverfahrens „Sockentupfer“ hinsichtlich der Anwendung in verschiedenen Haltungssystemen beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse der Sammelstaub- und Sockentupferanalysen nach Mast- und Zuchtbeständen getrennt betrachtet. Die folgende **Tabelle 5** gibt die Resultate der Berechnungen wieder.

Tabelle 5: Paarweiser Vergleich von Probenahmeverfahren nach McNemar und Berechnung des Kappa-Index für Staub- und Sockentupferproben getrennt nach Mast- und Zuchtbeständen.

Anzahl vergleichener Bestandsbeprobungen	Probenahmeverfahren 1	Anzahl pos. Beprobungen mit Verfahren 1	Prozent pos. Beprobungen mit 1	Probenahmeverfahren 2	Anzahl pos. Beprobungen mit Verfahren 2	Prozent pos. Beprobungen mit 2	Kappa	95% untere Grenze VB	95% oberere Grenze VB	P
105 (Mast)	Staub	62	59,05	Socken	98	93,33	0,0512	-0,0656	0,1680	<0,0001
86 (Zucht)	Staub	54	62,79	Socken	65	75,58	0,3846	0,1848	0,5843	0,0218

Die P-Werte bestätigen, dass mittels Sockentupferprobenahme gegenüber der Staubbeprobung in Mast- und Zuchtbeständen signifikant häufiger MRSA nachgewiesen wurde. Das Verhältnis der Anteile positiver Proben ist im Zuchtbereich jedoch geringer. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf unterschiedlich starke MRSA Belastung in der Tierumgebung bzw. verschieden hohe Anteile an kolonisierten Tieren in Mast- und Zuchtbeständen zurückzuführen. Im Folgenden werden daher quantitative Ergebnisse der Tierbeprobungen und der Umgebungsproben aus Mast- und Zuchtbeständen gegenübergestellt.

3.1.1.2 Untersuchungen zur MRSA Belastung der Tierumgebung und zum Anteil positiver Proben vom Tier in Mast- und Zuchtbetrieben

Zunächst wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der Häufigkeit der Nachweise beim Probenahmeverfahren Nasenpool zwischen MRSA positiven Mast- und Zuchtbeständen gibt. Positiv bedeutet hier, dass ein untersuchter Bestand in mindestens einer Probe MRSA positiv bestätigt wurde. Für den Vergleich konnten aus Langzeit- und Querschnittsstudien von 46 Beständen (24 Zucht- und 22 Mastbestände) 61 Poolproben (Mast $n = 28$, Zucht $n = 33$) ausgewertet werden. In Mastbeständen wurden durchschnittlich 11 positive Nasenpoolproben gewonnen, während in Zuchtbeständen im Schnitt 8 positive Proben gezogen wurden. Der Vergleich der Datensätze aus Mast und Zucht ergab im U-Test (zweiseitig) einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

Einen ebenfalls signifikanten Unterschied (U-Test zweiseitig, $p < 0,01$) ergab die Betrachtung der relativen Anzahl von Probenahmeverfahren mit denen MRSA in den Tierbeständen nachgewiesen wurde. In den Teilprojekten 029 und 041 wurden in insgesamt 29 verschiedenen Beständen 8 bis 11 verschiedene Probenahmeverfahren zeitgleich eingesetzt. Durch die teilweise mehrfache Beprobung einzelner Bestände lagen Daten aus 46 Bestandsuntersuchungen vor (21 in Mast- und 25 in Zuchtbetrieben). Der Anteil der verschiedenen Probenahmeverfahren, mit denen MRSA im Bestand nachgewiesen werden konnte, betrug bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten Verfahren im Mittel 87,1 % in Mastbeständen und 59,6% in Zuchtbetrieben. MRSA wurde demnach deutlich häufiger in verschiedenen Proben aus Mastbeständen gefunden. Zur Frage, ob möglicherweise die Quantität von MRSA in Proben der Tierumgebung einen Einfluss auf die oben angeführten Beobachtungen hat, wurden quantitative Umgebungsproben in Mast- und Zuchtbeständen verglichen.

In **Tabelle 6** wird deutlich das die Keimzahlen an MRSA in Staubproben erheblichen Schwankungen unterliegen können. Die gemessenen Keimkonzentrationen sind nicht normalverteilt (Shapiro-Wilk-test, $p < 0,01$). Die Mediane liegen in der gleichen Größenordnung, wobei festgestellt werden kann, dass höheren Keimzahlen im Staub von Zuchtbeständen gefunden wurde. Allerdings sind diese Ergebnisse durch drei Probenahmen in einem scheinbar sehr stark belasteten Zuchtbetrieb (Mittelwert $1,58 \times$

10⁶ KBE/g Staub) maßgeblich beeinflusst. Die Anwendung des U-Test (zweiseitig) ergab letztlich keinen signifikanten Unterschied zwischen den gemessenen Größen in Mast- und Zuchtbeständen ($p > 0,05$).

Tabelle 6: MRSA Konzentrationen [KBE/g] in Staubproben

Haltung	Anzahl untersuchter Staubproben	Minimum	Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Maximum
Mast	17	5000	15000	27000	101000	998000
Zucht	14	1000	9000	43000	75000	2300000

Auch die MRSA Konzentrationen der Sockentupfer in **Tabelle 7** unterliegen einer großen Schwankungsbreite. Die ermittelten Konzentrationen waren nicht normalverteilt (Shapiro-Wilk-test, $p < 0,01$), zeigen aber bei den Median- und Quartilwerten gute Übereinstimmungen. Daher wurde erwartungsgemäß kein signifikanter Unterschied zwischen den in den Sockentupfern gefundenen MRSA Konzentrationen aus Mast- und Zuchtbeständen festgestellt (U-Test zweiseitig, $p > 0,05$).

Tabelle 7: MRSA Konzentrationen [KBE/Tufer] in Sockentupfern

Haltung	Anzahl untersuchter Sockentupferpaare	Minimum	Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Maximum
Mast	101	2250	4500	12319	42975	888750
Zucht	95	2250	2250	11250	31163	1732500

An dieser Stelle sei noch erwähnt, dass etwa 55% aller in den Schweineställen der verschiedenen Teilprojekte genommenen Sockentupferproben ($n=365$) quantitativ ausgewertet werden konnten. Demgegenüber standen ca. 70% positive Sockentupferproben nach Anwendung der Anreicherung. In 14 Fällen konnte MRSA nur mit der quantitativen Methode nachgewiesen werden. D.h. die quantitative und qualitative Untersuchung eines Sockentupferpaares erhöhte die Nachweisraten auf rund 74%.

Die MRSA Konzentrationen in den Sedimentationsstaubproben sind auf die Staubmasse bezogen niedriger als die der Sammelstaubproben (vgl. **Tabelle 6 und 8**). Es liegen wiederum keine normalverteilten Daten (Shapiro-Wilk-Test, $p < 0,01$) vor. Ebenso kann

kein signifikanter Unterschied zwischen den in Mast- und Zuchtbeständen gemessenen Konzentrationen erkannt werden (U-Test zweiseitig, $p > 0,05$).

Tabelle 8: MRSA Konzentrationen [KBE/g] in Sedimentationsstaubproben

Haltung	Anzahl untersuchter Sedimentationsstäube	Minimum	Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Maximum
Mast	33	1000	2860	5900	18500	125000
Zucht	30	1000	2075	4770	14100	1200000

Der Vergleich der quantitativen Umgebungsproben in MRSA positiven Mast- und Zuchtbeständen ergab keinen Hinweis auf einen Unterschied in den Keimbelastungen der verschiedenen Probenmatrizes. Die höheren Nachweishäufigkeiten mittels verschiedener Probenahmeverfahren und insbesondere der Sockentupfern in Mastbetrieben werden vermutlich noch durch andere Faktoren, wie z.B. das Hygienemanagement, beeinflusst. So wäre beispielsweise denkbar, dass die mit den Sockentupfern abgeschrittenen Stallgänge im Zuchtbetrieb regelmäßiger gereinigt werden als im Mastbetrieb. Zudem beeinflussen hohe Keimzahlen im Staub nicht automatisch maßgeblich die Ergebnisse von Oberflächenbeprobungen. Zum Beispiel zeigt eine Korrelationsanalyse von zeitgleich in 32 Beständen genommenen Staub- und Sockentupferproben nur eine schwache bis mittleren Abhängigkeit der Ergebnisse (Kendallscher Tau-b-Korrelationskoeffizient = 0,35; $p = 0,0062$).

Insgesamt sollte in der Diskussion berücksichtigt werden, dass eine begrenzte Anzahl von Bestandsuntersuchungen durchgeführt wurde und somit z.B. wiederholte Untersuchungen (7 Bestandsbeprobungen) in zwei niedrig prävalenten Zuchtbetrieben, die oben aufgeführten Ergebnisse beeinflussen konnten.

Werden mögliche Zusammenhänge zwischen Umgebungsbelastung und Anzahl positiver Tiere im Bestand unabhängig vom Haltungsverfahren betrachtet, kann auf größere Datensätze zurückgegriffen werden. Für eine Korrelationsanalyse wurde zunächst eine Datentransformation vorgenommen. Die Anzahl positiver Umgebungsproben und die Anzahl positiver Einzeltupfer aus der Nase oder von der Hautoberfläche der Tiere wurden ins Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Probestellen bzw. beprobten Tiere gesetzt. Ein Beispiel: Es wurden in einem Bestand 6 Umgebungsproben und 12 Nasentupfer von zufällig ausgewählten Schweinen genommen. Vier von 6

Umgebungsproben und 10 von 12 Tupfern waren positiv. Daraus ergeben sich die Quotienten 0,67 bzw. 0,83. Diese aus den einzelnen Bestandsuntersuchungen ermittelten Quotienten wurden paarweise aufgelistet und mittels der Prozedur CORR im SAS System berechnet. In den **Tabellen 9** und **10** sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 9: Mittlere Nachweisraten von Umgebungsproben und Tiertupfern in Schweinebeständen

Variable	Anzahl Bestandsbeprobungen	Mittelwert	Std.-Abweichung	Median	Minimum	Maximum
Umgebungsproben	46	0,60518	0,35906	0,71429	0	1,00000
NasentupferAD*	42	0,74008	0,35413	0,91667	0	1,00000
NasentupferD**	45	0,34259	0,33059	0,25000	0	1,00000
HauttupferAD*	43	0,72093	0,35629	0,91667	0	1,00000
HauttupferD**	44	0,50758	0,37043	0,41667	0	1,00000

* AD bedeutet, dass die Tupfer mittels Anreicherung und im Direktausstrich untersucht wurden

**D bedeutet, dass die Tupfer nur im Direktausstrich untersucht wurden

Die Mittelwerte in **Tabelle 9** zeigen, dass die Untersuchung der Nasen- und Hauttupfer mit anschließender Anreicherung deutlich höhere Nachweisraten besitzen als der Direktausstrich. Die angereicherten Tupfer weisen ähnliche Nachweisraten auf, die stark miteinander korrelieren (**Tabelle 10**). Die Nachweishäufigkeiten in den angereicherten Tupfern korrelieren ebenfalls gut mit den Nachweishäufigkeiten der Tierumgebungsproben. Dies gilt auch für den direkt ausgestrichenen Hauttupfer, nicht aber für den direkt ausgestrichenen Nasentupfer, der eher nur in einem schwachen Zusammenhang mit den Nachweishäufigkeiten der Umgebungsproben steht. Eine sehr starke Korrelation weisen angereicherter und direkt ausgestrichener Hauttupfer auf, während die Häufigkeiten bei den Nasentupfern nur mittelstark korrelieren. Unter Umständen können mit den Hauttupfern größere Anzahlen an MRSA gesammelt werden, wodurch der Nachweis im Direktausstrich eher möglich wird. Ein quantitativer Vergleich von Keimzahlen in Hauttupfern und Nasentupfern ist nicht möglich, da nur die quantitative Untersuchung von Nasentupfern im Projekt vorgesehen war. Die Ergebnisse zu letztgenannten Untersuchungen sind im Teilbericht Emissionen (TP029 gemeinsam mit TP 041) bzw. in der Publikation von Friese et al. (2012) im Einzelnen aufgeführt. Die

MRSA Konzentrationen im Staub korrelierten mit denen der quantifizierten Nasentupfer schwach bis mittelmäßig (Spearman's rho = 0,45).

Tabelle 10: Signifikante Kendallsche Tau-b-Korrelationskoeffizienten für die Betrachtung der Variable Umgebungsproben mit verschiedenen Tiertupfervariablen

	NasentupferAD	NasentupferD	HauttupferAD	HauttupferD
Umgebungsproben	0,60802 (p < 0,0001)	0,32940 (p = 0,0034)	0,57439 (p < 0,0001)	0,55594 (p < 0,0001)
NasentupferAD		0,50825 (p < 0,0001)	0,71479 (p < 0,0001)	0,67155 (p < 0,0001)
NasentupferD			0,48818 (p < 0,001)	0,58441 (p < 0,001)
HauttupferAD				0,80496 (p < 0,001)

Insgesamt kann festgehalten werden, dass eine Abhängigkeit zwischen der Nachweishäufigkeit in Tiertupfern und der Nachweishäufigkeit in der Tierumgebung zu bestehen scheint, die nach der durchgeführten Korrelationsanalyse für den direkt ausgestrichenen und anschließend angereicherten Nasentupfer am stärksten ausfällt. Dieser Tupfer, der von jeweils 12 Tieren während 42 Bestandsuntersuchungen (18 x Mast und 14 x Zucht) in positiven Beständen genommen wurde, wurde hinsichtlich der Nachweishäufigkeit in Zucht- und Mastbeständen verglichen. Es wurden hoch signifikant (U-Test zweiseitig, p < 0,001) mehr positive Einzeltiere in Mastbeständen nachgewiesen. Im Durchschnitt wurden 11,6 von 12 Tieren in Mastbeständen und 6,9 von 12 Tieren in Zuchtbeständen positiv getestet.

3.1.1.3 Probenahme in negativen Schweinebeständen

Im Rahmen des Probenahmeverfahrens wurden vier eingangs negativ beprobte Schweinebestände und ein niedrig prävalenter Zuchtbestand mit hohem Hygienestandard im weiteren Verlauf vier- bis fünfmal beprobt, um den MRSA Status zu beobachten. Dazu wurden während der Bestandsbesuche regelmäßig Staub- Sockentupfer-, Kot-, Nasentupfer-, Hauttupfer- und Futtersammelproben genommen. In einzelnen Fällen

wurden zusätzliche Probenahmeverfahren eingesetzt. **Tabelle 11** zeigt den MRSA-Status der verschiedenen Bestände in der Zeitabfolge.

Tabelle 11: MRSA Status in vier Zuchtbeständen und einem Mastbestand im Zeitverlauf

Bestand	1. Beprobung	2. Beprobung	3. Beprobung	4. Beprobung	5. Beprobung
Zucht 1	03.11.2009 negativ	16.11.2009 negativ	07.12.2009 negativ	18.01.2010 positiv im Hauttupfer	15.02.2010 negativ
Mast	16.11.2009 negativ	07.12.2009 negativ	18.01.2010 positiv im Hauttupfer	15.02.2010 negativ*	23.03.2010 negativ
Zucht 2	20.08.2009 negativ	16.11.2009 positiv im Sockentupfer	22.02.2010 positiv in Nasen- und Hauttupfer	16.08.2010 positiv in einer Luftprobe	
Zucht 3	08.02.2010 positive Nasentupfer	10.05.2010 positive Nasen- und Sockentupfer	09.08.2010 positive Luftprobe	25.10.2010 negativ	
Zucht 4	26.04.2010 negativ	21.06.2010 negativ	04.10.2010 positive Luftprobe	29.11.2010 negativ	

* Der leere Stall wurde nach der Reinigung und Desinfektion durch Tupfer von verschiedenen Oberflächen (Spielzeuge, Buchtenwände, Boden, Futtertrog) beprobt.

Die Beprobungszeiträume lagen zwischen etwa 4 (Zucht 1 und Mast) und 12 Monaten (Zucht 2). Der MRSA-Status wechselte in allen Betrieben, wobei anzumerken ist, dass MRSA generell nur in einzelnen Proben nachgewiesen werden konnte. Eine Ausnahme bildete der Zuchtbestand 3 in dem zwischen 2 und 6 positive Nasenpooltupfer gewonnen wurden. Allerdings konnten in zwei darauf folgenden Probenahmen keine Tiere mehr positiv getestet werden. In den Zuchtbeständen 1, 2 und 3 herrschte augenscheinlich ein gutes Hygienemanagement (Schleusen vorhanden, Schwarz-Weiß-Trennung, saubere Gänge). Eine Verbreitung in diesen Beständen durch einzelne MRSA positive Tiere konnte nicht festgestellt werden. Im Falle des zweiten Zuchtbestandes konnte beobachtet werden, dass vor der dritten Beprobung sehr wahrscheinlich MRSA positive Sauen zugekauft wurden. Die Beprobung der Sauen erfolgte im Isolierstall vor der Einstallung. Sechs Tiere waren im Nasentupfer MRSA positiv. Dennoch wurden sechs Monate später keine positiven Tiere im Bestand gefunden. Die positive Luftprobe in diesem Bestand

könnte durch die zuvor positiven Tiere hervorgerufen worden sein, allerdings sind im unmittelbaren Umfeld des Bestandes Geflügelbestände und ein Rinderbestand, so dass hier eine Transmission von außen nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Das gleiche gilt für den Zuchtbestand 4, in dessen Umfeld größere konventionell betriebene Mastschweinställe liegen.

Interessant sind auch die Befunde aus dem Mastbetrieb. Zum Ende der ersten Mast traten einzelne positive Hauttupfer auf. Im anschließend gereinigten und desinfizierten Stall sowie am Anfang des neuen Mastdurchganges wurde jedoch kein MRSA im Bestand gefunden.

3.1.2 Befunde aus Geflügelmastbeständen

Es lagen insgesamt 38 Bestandsuntersuchungen aus Quer- und Langzeitstudien von 7 Mastputen- und 6 Broilerbeständen aus den Teilprojekten 029 und 041 zugrunde. Wie beim Schwein sollte auch beim Mastgeflügel untersucht werden, welches Probenahmeverfahren zur Bestimmung des MRSA- Status eines Betriebes am besten geeignet erscheint. In den Beständen wurden zeitgleich bis zu 11 verschiedenen Probenahmeverfahren eingesetzt. Für die statistische Auswertung hinsichtlich signifikanter Unterschiede in den Nachweishäufigkeiten der einzelnen Verfahren wurde wie bei der Auswertung beim Schwein verfahren. Die folgende **Tabelle 12** gibt eine Übersicht über die Ergebnisse.

Anders als beim Schwein sind Staubproben und auch Sedimentationsstäube häufiger positiv ausgefallen als die anderen Tierumgebungsproben. Insbesondere der Sockentupfer scheint weniger gut für die Beprobung von eingestreuten Geflügelmastställen zu sein. Die Hautpoolproben waren gegenüber dem Staub das signifikant ($p = 0,0348$) sensitivste Verfahren. Die Häufigkeiten der gepoolten Choanen- und Hauttupfer sind nicht signifikant voneinander verschieden. Das Gleiche gilt für die gepoolten Coanentupfer und den angereicherten Hauttupfer. Haut- und Choanentupfer zeigen gute Übereinstimmung in den Kappa-Werten. Zwischen den Proben aus Staub und von den Tieren stimmen die Beobachtungen weniger gut überein. Eine Kombination aus Staub- und Hautpooltupfern erzielte die höchste Nachweisrate mit 25 positiven von 35 Bestandsuntersuchungen

(71,4% positive). Es sollte berücksichtigt werden, dass die Hauttupfer bei Broilern und Puten von verschiedenen Stellen stammen (unter dem Flügel bzw. Halsfalten) und das 63% der Bestandsuntersuchungen in der Putenmast stattfanden.

Tabelle 12: Paarweiser Vergleich von Probenahmeverfahren in Geflügelmastbetrieben nach McNemar und Berechnung des Kappa-Index.

Anzahl vergleichener Bestandsbeprobungen	Probenahmeverfahren 1	Anzahl pos. Beprobungen mit Verfahren 1	Prozent pos. Beprobungen mit 1	Probenahmeverfahren 2	Anzahl pos. Beprobungen mit Verfahren 2	Prozent pos. Beprobungen mit 2	Kappa	95% untere Grenze VB	95% oberere Grenze VB	P
15	Staub	7	46,67	SedStaub	8	53,33	0,8673	0,6181	1,0000	0,3173
38	Staub	16	42,11	Socke	11	28,95	0,6053	0,3528	0,8578	0,0588
35	Staub	16	45,71	Kot	4	11,43	0,1434	-0,0870	0,3738	0,0013
36	Staub	16	44,44	ChoanenPool	22	61,11	0,3494	0,0633	0,6355	0,0833
35	Staub	16	45,71	ChoaneEinzelnA	19	54,29	0,3760	0,0745	0,6775	0,3657
35	Staub	16	45,71	Choane EinzelnD	13	37,14	0,5910	0,3247	0,8573	0,2568
35	Staub	16	45,71	HautPool	23	65,71	0,3879	0,1106	0,6652	0,0348
35	Staub	16	45,71	HautEinzelnA	21	60,00	0,4944	0,2205	0,7682	0,0956
35	Staub	16	45,71	HautEinzelD	17	48,57	0,5990	0,3338	0,8642	0,7055
18	Staub	8	44,44	UmgebungAD	5	27,78	0,4156	0,0114	0,8198	0,1797
35	Staub	16	45,71	Futter	13	37,14	0,4741	0,1837	0,7646	0,3173

Anzahl verglicher Bestands- beprobungen	Probenahme- verfahren 1	Anzahl pos. Beprobungen mit Verfahren 1	Prozent pos. Be- probungen mit 1	Probenahme- verfahren 2	Anzahl pos. Beprobungen mit Verfahren 2	Prozent pos. Be- probungen mit 2	Kappa	95% untere Grenze VB	95% oberere Grenze VB	P
20	Staub	9	45,00	Einstreu	2	10,00	0,2391	-0,0558	0,5340	0,0082
35	Staub	16	45,71	Filter	11	31,43	0,5868	0,3258	84,79	0,0588
34	Staub	16	47,06	Impinger	12	35,29	0,6408	0,3878	0,8938	0,1025
34	Filter	11	32,35	Impinger	12	35,29	0,6718	0,4084	0,9352	0,6547
33	ChoanenPool	21	63,64	HautPool	23	69,70	0,7284	0,4820	0,9747	0,3173
33	ChoanenPool	21	63,64	HautEinzelnA	21	63,64	0,7381	0,4982	0,9780	1,0000
35	HautPool	23	65,71	HautEinzelnA	21	60,00	0,8780	0,7152	1,0000	0,1573

3.1.3 Befunde aus Milchviehbeständen

Es wurden vier Milchviehbestände beprobt. Zwei davon viermal im Zeitverlauf und in zwei Betrieben konnten nur einmal Untersuchungen durchgeführt werden. In den Beständen kamen bis zu 9 verschiedene Probenahmeverfahren zum Einsatz. Gegenüber der Beprobung in Schweinebeständen wurden zusätzlich Vorgemelk- und Sammelgemelkproben untersucht. Der Hauttupfer wurde von der Analfalte genommen. **Tabelle 13** fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle13: MRSA Status in vier Milchviehbeständen

Bestand	1.Beprobung	2. Beprobung	3. Beprobung	5. Beprobung
1	20.08.2009 negativ	22.04.2010 negativ	17.08.2010 positiv in der Einstreu	03.05.2011 positiv in der Einstreu
2	08.02.2012 negativ			
3	19.10.2010 negativ	06.12.2010 positive Nasen- und Hauttupfer	22.03.2011 negativ	12.05.2011 negativ
4	16.05.2011 negativ			

Die zwei Beprobungen der Bestände 2 und 4 fielen MRSA negativ aus. In den Verlaufsuntersuchungen über 19 bzw. 7 Monate wechselte der MRSA Status der beprobten Bestände 1 und 3. Obwohl MRSA im Bestand 1 wiederholt in einer Umgebungsprobe nachgewiesen wurde, konnten weder Tiere noch Milchproben positiv getestet werden. In Bestand 3 wurden 3 positive Nasenpoolproben gezogen, dennoch blieb der Bestand in den darauf folgenden Beprobungen negativ. Der MRSA Eintrag oder das Vorkommen von MRSA in einen Milchviehbestand, scheint nicht zwingend mit einer Verbreitung im Bestand einherzugehen.

3.2 Diskussion der Ergebnisse

Staphylococcus aureus ist ein fakultativ pathogenes Bakterium, das Haut- und Schleimhäute von Menschen und Tieren vorübergehend (transient) oder dauerhaft (resident) besiedeln kann. Nasentupfer und Hauttupfer von spezifischen Körperregionen sind daher typische Methoden, die bereits seit Jahrzehnten eingesetzt werden, um Staphylokokken auf Hautoberflächen von Menschen und verschiedenen Tierspezies nachzuweisen (Kloos et al. 1992, Shumizu et al. 1992). Im Staub liegt *S. aureus* i.d.R. an Haut- oder Schleimhautzellen gebunden vor und ist aufgrund seiner relativ hohen Tenazität gegenüber Umwelteinflüssen aus Staubproben über lange Zeiträume kultivierbar. Eigene weiterführende Untersuchungen außerhalb dieses Vorhabens (Daten nicht im Bericht aufgenommen) haben gezeigt, dass Methicillin resistente *S. aureus* Isolate aus Schweinehaltungen mindesten 12 Monate in Stallstaub überleben können und kultivierbar bleiben, wenn auch die absoluten Keimzahlen deutlich abnehmen.

Die Beprobung von Stallstäuben und die Beprobung von Nasenvorhöfen bei Tieren sind daher wichtige Verfahren zur Bestimmung des MRSA Status eines Tierbestandes. Allerdings ist noch nicht hinreichend geklärt, wie effizient diese Verfahren im Vergleich zueinander und im Vergleich zu anderen Probenahmeverfahren MRSA in Tierbeständen tatsächlich nachweisen. Zudem gibt es kaum Informationen über MRSA Konzentrationen aus Tier- oder Umweltproben, die z.B. einen wichtigen Beitrag für ätiologische und epidemiologische Betrachtungen darstellen können oder auch der Bewertung von Hygienemaßnahmen dienen können. Die Hauptaufgabe dieses Teilprojektes lag in der Prüfung der Effizienz verschiedener Probenahmeverfahren mit dem Focus auf der Schweinehaltung. Im Folgenden werden daher zunächst die Ergebnisse aus den Untersuchungen von Mast- und Zuchtschweinebeständen diskutiert.

3.2.1 Untersuchungen in Mast- und Zuchtschweinebeständen

Es wurden Methoden zur Beprobung der Tiere und ihrer Umgebung entwickelt, die qualitativ und quantitativ analysiert werden konnten. Es wurden insgesamt 14 verschiedene Stellen am Tier und im Stall untersucht. In allen beprobten Oberflächen, in

der Luft, im Kot und in Futterproben aus Trögen im Stall konnte MRSA nachgewiesen werden. Dies zeigt das hohe Verbreitungspotential des Keims im Stall über den Kontakt der Tiere oder über den belasteten Staub, der sich über die Luft im Stallraum ausbreitet. Im Staub wurden unabhängig von Mast- oder Zuchtbetrieb regelmäßig MRSA Konzentrationen von $> 10^4$ und bis etwa 10^6 KBE/g Staub gemessen. Trotz dieses Verbreitungspotentials war die Beprobung des Stallstaubes nicht das sensitivste Nachweisverfahren zur Bestimmung des MRSA Status eines Bestandes. Sowohl in Zucht- als auch in Mastbetrieben waren der Einsatz und die Analyse der Sockentupferprobe, das Verfahren mit der signifikant höchsten Nachweisrate in der Tierumgebung im Stall. Vermutlich wird mit dem Sockentupfer gegenüber dem Sammelstaub eine andere Qualität von Partikel erfasst, die z.B. größere Aggregate mit anhaftenden Bakterien bilden und einen höheren Anteil an Kotpartikeln besitzen, in denen z.B. auch von den Tieren ausgeschiedene MRSA gefunden werden können. Einen ganz wesentlichen Einfluss auf den Nachweis mag aber auch die große Oberfläche besitzen, die durch das Abschreiten des Stalles mit den Sockentupfern erfasst wird. Die Gründe für die deutlich höhere Nachweisrate gegenüber der Staubbeprobung können im Einzelnen nicht geklärt werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass sich sowohl der Aufwand für die Anwendung des Verfahrens im Stall, als auch der Aufwand für die Aufarbeitung und Analyse im Labor, in Grenzen hält. Demnach ist das Verfahren z.B. für ein „Screening“ von MRSA in der Tierumgebung von Schweinehaltungen geeignet, auch wenn der Nachweis mit dem Verfahren, wie unter 4.1.2 angedeutet, durch innerbetriebliche Hygienemaßnahmen vermutlich erheblich beeinflusst werden kann. Unterstützt wird die Eignung des Nachweisverfahrens noch durch die Befunde der Oberflächenbeprobungen im Außenbereich in den Teilprojekten 29 und 41, in denen MRSA regelmäßig auch in größeren Entfernungen zum Stall (300m Abstand) mit dieser Methode nachgewiesen werden konnte. Dennoch stellt der Sockentupfer nicht das sensitivste Nachweisverfahren für MRSA in Schweinebeständen dar. Nasen- und Hauttupfer und deren Analyse in Fünfergruppen waren bei der Untersuchung von 60 Tieren im Bestand im direkten Vergleich mit der Sockentupferprobe die signifikant sensitiveren Methoden für den MRSA- Nachweis im Tierbestand. Da mehrfach MRSA, wenn auch sehr selten, zwar in Sockentupfern aber parallel nicht in Nasen- oder

Hautpoolproben nachgewiesen werden konnte- und umgekehrt, dürfte die gleichzeitige Beprobung der Tiere- und der Tierumgebung die Methode der Wahl sein und eine sehr hohe Nachweissicherheit ergeben. Eine ähnliche Beobachtung machten bereits Broens et al. (2011), die Nasenpoolproben in Sechsergruppen und Staubwischproben in Mast- und Zuchtbeständen genommen und miteinander verglichen haben. Von der Sensitivität her wäre auch der etwas einfacher und Tier schonend zu nehmende Hautpooltupfer für den Nachweis am Schwein geeignet. Diese Lokalisation kann jedoch erheblich stärker von Tiermanagementmaßnahmen, wie z.B. der Zuchtsauenwaschung, und von der Sauberkeit der Tierumgebung beeinflusst werden als der Nasentupfer, wodurch Prävalenzerhebungen, die sich allein auf Hautpooltupfer stützen, weniger belastbar und schwerer zu interpretieren sein dürften.

Die zahlreich im Verbund eingesetzten qualitativen und quantitativen Probenahmeverfahren, insbesondere der Teilprojekte 029 und 041, ermöglichten die statistische Untersuchung auf mögliche Zusammenhänge zwischen Nachweishäufigkeiten bzw. gemessenen Keimkonzentrationen im Stall und der Anzahl MRSA positiver Tiere.

Wurden die Keimzahlen in den Tierumgebungsproben aus Mast- und Zuchtbeständen miteinander verglichen, so trat MRSA in ähnlichen Konzentrationen in den verschiedenen Matrices auf. Es können also ähnlich hohe Belastungen in der Tierumgebung von Zucht- und Mastbeständen und damit auch in verschiedenen Haltungssystemen vorliegen. Dies erscheint zunächst im Widerspruch zu dem Ergebnis zu stehen, dass signifikant weniger MRSA positive Zuchtschweine in positiven Beständen detektiert wurden. Allerdings sind in Zuchtbeständen generell, und insbesondere in den niedrig prävalenten Zuchtbeständen, die Umgebungsproben häufiger negativ und somit nicht in die Keimzahlbestimmung von Staub- und Sockentupfern eingegangen, was den oben genannten scheinbaren Widerspruch erklären dürfte.

Insgesamt zeigten die positiven Korrelationen zwischen der Anzahl positiver Einzeltiere und der Anzahl positiver Tierumgebungsproben in Mast- und Zuchtbeständen einen starken Zusammenhang. Es können also signifikant häufiger positive Umgebungsproben in Beständen gezogen werden, wenn die Anzahl positiver Tiere ansteigt. Es wird vorgeschlagen, dass dieser in sich logische Zusammenhang zukünftig in einer Risikoanalyse gemeinsam mit dem BfR noch genauer untersucht wird, um

herauszustellen, welche Risikofaktoren für eine Verbreitung von MRSA im Bestand hauptsächlich verantwortlich sind. Wichtige Bestandsdaten sind dafür erhoben und aufgearbeitet worden und stehen für weitere Analysen zur Verfügung. In diesem Zusammenhang dürfte auch eine weitergehende Typisierung von MRSA Isolaten, die keine Aufgabe in diesem Teilprojekt war, von Bedeutung sein, um die Verbreitungsmuster bestimmter MRSA Typen in den Beständen näher charakterisieren zu können. Gerade die Untersuchungen in den niedrig prävalenten Beständen mit wechselndem MRSA Status zeigen, dass der MRSA Eintrag in einen Bestand nicht zwingend mit einer Verbreitung im Tierbestand einhergehen muss. Ein hoher Hygienestandard, gekoppelt mit einer zweckmäßigen Bestandsabschirmung bei Vermeidung des Zukaufs MRSA positiver Tiere, könnte daher vermutlich der Schlüssel zur Etablierung oder Aufrechterhaltung MRSA freier Bestände sein.

Auf Grundlage der in den Untersuchungen beim Schwein erzielten Befunde können die vom Projektträger eingangs gestellten Fragen im Zuge der Hypothesenprüfung wie folgt beantwortet werde:

- 1) Nein, das Vorkommen von MRSA aus Staubproben kann nicht mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden.
- 2) Ja, im Kompartiment Nase kann MRSA am Häufigsten nachgewiesen werden.
- 3) Ja, der Anteil MRSA positiver Tiere im Bestand schwankt in Abhängigkeit einer Reihe unterschiedlicher Einflussfaktoren (z.B. Haltungssystem, Management, Nachweishäufigkeiten in Tierumgebungsproben)

Inwieweit der letzte Punkt auch für die Verteilung MRSA positiver Tiere im Bestand gilt, kann hier nicht beantwortet werden. Diesbezüglich wird auf die Verlaufsstudien in den Teilprojekten 020 und 030 verwiesen, in denen der Status von bestimmten Tieren über längere Zeiträume beobachtet wurde.

3.2.2 Untersuchungen in Geflügelmastbeständen

Die Auswertung der Daten aus dem Mastgeflügelbereich beruht ausschließlich auf den Datenerhebungen in den Teilprojekten 029 und 041. Sieben Mastputen und 6 Masthühnerbestände wurden z. T. mehrfach beprobt, so dass für einen Vergleich der Nachweishäufigkeiten mit verschiedenen Probenahmeverfahren insgesamt 38 Bestandsuntersuchungen zugrunde lagen. Die Beprobungen von Sedimentationsstäuben (n=15), von Einstreu (n=20) und Umgebungstupfern (n=18) ergaben für alle Verfahren etwa 45% positive Nachweise, spielen aber aufgrund der geringen Stichprobe statistisch keine weitere Rolle. Dennoch zeigen die positiven Befunde in den beprobten Materialien bzw. auf den beprobten Oberflächen, dass MRSA auch innerhalb von Mastgeflügelbeständen weit verbreitet sein kann.

Der häufigste Nachweis von MRSA in den Beständen gelang mit den gepoolten Hauttupfern, gefolgt von den einzeln analysierten Hauttupfern und den Choanentupfern. Die Nachweishäufigkeiten mittels Haut- und Choanentupfer zeigten keine signifikanten Unterschiede. Staphylokokken einschl. der Species *S. aureus* kolonisieren die Haut von Hühnern und Puten und binden an Epithelien des Atemtraktes (Shimizu et al. 1992; Jensen et al. 1986). Insofern scheinen beide Lokalisationen für eine erfolgreiche Probenahme geeignet, was durch gute Übereinstimmungen zwischen den beiden Lokalisationen zum Ausdruck kommt. Dennoch waren die gepoolten Hauttupfer die einzigen Proben vom Tier, die in der Nachweishäufigkeit signifikant besser abschnitten ($p < 0,05$), als die Staubsammelproben. Letztere stellten die empfindlichsten Tierumgebungsproben dar und anders als beim Schwein spielte der Sockentupfer als alternatives Nachweisverfahren in Mastgeflügelställen nur eine untergeordnete Rolle. Eine Kombination aus Hautpool- und Staubproben erreichte die höchste Nachweishäufigkeit, wenn je ein Probenahmeverfahren am Tier und ein Verfahren zur Umgebungsbeprobung berücksichtigt wurde. Während die Beprobung des Staubes und der Halshaut bei den Mastputen aufgrund der Datenlage aus dem Projekt eine aussichtsreiche Vorgehensweise zur MRSA- Stuserhebung von Mastputenbeständen zu sein scheint, kann aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten positiven Broilerbeständen bislang noch keine allgemeine Aussage bei Masthühner getroffen werden. Es wird empfohlen, in noch größerem Umfang auf Bestandsebene zu

untersuchen, ob potentielle Stellen, wie z.B. die Choane, die Kopfhaut oder der Bereich unterm Flügel, für einen Nachweis von der Haut der Tiere geeignet sind.

Auch außerhalb der Stallungen wurden Untersuchungen durchgeführt, die im Detail im Bericht des Emissionsprojektes (TP029 und TP41) geschildert sind. Besonders interessant sind die Befunde der Außensockentupferproben, die wie im Umfeld von Schweinehaltungen Oberflächenkontaminationen mit MRSA zeigten. In einem Fall konnten in zwei aufeinander folgenden Mastdurchgängen die Umgebung eines Broilerstalles positiv getestet werden, während im Bestand kein MRSA nachgewiesen wurde. Zudem wurde auch der Halter positiv getestet. Ein Eintrag von MRSA in den Bestand, obwohl Halter und Umgebung positiv getestet waren, konnte nicht beobachtet werden. Für Geflügel ist lange bekannt, dass es Zusammenhänge zwischen der Virulenzeigenschaft von *S. aureus* und der Bindung an Zellen bestimmter Gewebe oder Organe gibt (Jensen et al. 1986). Eine Typisierung und Betrachtung der Virulenzeigenschaften von verschiedenen Isolat, die sich im Bestand ausgebreitet bzw. nicht ausgebreitet haben, könnte helfen, die Ausbreitungsdynamik von MRSA Typen zukünftig noch besser zu verstehen.

3.2.2 Untersuchungen in Milchviehbeständen

Die Untersuchung von Milchviehbeständen konnte nicht vollständig abgeschlossen werden, was zum einen mit der offenbar niedrigen MRSA Prävalenz in Milchviehbeständen (Friedrich et. al 2011) und zum anderen mit der Schwierigkeit positive Bestände beproben zu dürfen zu tun hatte. Eine Beurteilung der Sensitivität der verschiedenen eingesetzten Probenahmeverfahren konnte auf Grund der geringen Probenzahlen nicht durchgeführt werden. Dennoch ergeben die Verlaufsuntersuchungen in zwei Beständen wichtige Hinweise. Trotz des hohen Beprobungsaufwandes (60 Tiere, 60 Vorgemelksproben und etliche Umgebungsproben) konnte MRSA bei wechselndem Status nur vereinzelt in den Beständen gefunden werden. Eine Ausbreitung wurde in den Beständen nicht beobachtet. Eine Typisierung könnte weitere Aufschlüsse darüber geben, ob zum Beispiel die in der Einstreu gefundenen Isolate von außen eingetragen wurden oder doch eher zu typischen Vertretern beim Rind gehören. Im Vorhaben wurden in

beiläufigen Untersuchungen z.B. Proben von Strohballen genommen, die in der Nähe eines MRSA positiven Mastputenbestandes gelagert wurden. Das Stroh war MRSA positiv. Es ist also denkbar, dass MRSA auch über eine kontaminierte Einstreu in Nutztierställe eingetragen werden kann, was aber nicht zwingend bedeutet, dass sich der Keim im Bestand auch ausbreiten muss.

Die Beobachtung, dass MRSA in einzelnen Proben in Beständen auftrat, sich im weiteren Untersuchungsverlauf aber nicht im Bestand ausbreitete, konnte sowohl beim Schwein als auch beim Mastgeflügel und auch beim Rind gemacht werden. Dies war nur aufgrund der sehr umfangreichen Beprobung der Bestände möglich geworden, in der Tier- und Tierumgebungsproben zeitgleich genommen und analysiert wurden. So wurden 60 Tiere untersucht, um statistisch eine Prävalenzgrenze von 5% zu erreichen. Bei einer Verringerung der Anzahl der beprobten Tiere auf z.B. 30, wären einige positiv getestete Bestände vom Status her als MRSA negativ eingestuft worden. Da die Beprobung der Tiere und die anschließende Laboranalyse von 12 Tupferpools mit einem relativ hohen Aufwand verbunden ist, könnte für die Stuserhebung ein Verfahren in zwei Stufen von Vorteil sein und Kosten ersparen. Sockentupferproben beim Schwein, Staubproben beim Geflügel und Sammelmilchproben von Milchviehbeständen könnten zur Detektion von MRSA in die bereits bestehenden Überwachungsprogramme einbezogen werden. Die Proben sind einfach zu nehmen und mit dem selektiven Anreicherungsverfahren steht ein gut etabliertes und sensitives Nachweisverfahren für MRSA zur Verfügung. Bei einem positiven Nachweis in der Milch oder in den Tierumgebungsproben kann die Statusbestimmung abgeschlossen werden. Im Falle von negativen Proben, müssten zur endgültigen Abklärung des Status, die direkte Beprobung der Tiere einbezogen werden.

4. Zusammenfassung

Es wurden qualitative und quantitative Probenahmeverfahren zur Beprobung von Nutztieren und ihrer Umgebung entwickelt und gemeinsam mit bereits etablierten Verfahren vor Ort in Nutztierställen eingesetzt. Insgesamt wurden 18 verschiedene Lokalisationen, 7 am Tier und 11 in der Tierumgebung, in Beständen der Nutztierarten Schwein, Mastpute, Masthuhn und Rind beprobt. Am Ende des Projektes konnten mehr

als 3200 Proben aus Untersuchungen in 56 Schweinebeständen, 13 Geflügelmastbeständen und vier Milchviehbeständen zusammengefasst und ausgewertet werden. Aufgrund verschiedener Fragestellungen in den einzelnen Teilprojekten, kamen bei den verschiedenen Tierarten nicht immer alle für die jeweilige Tierart zur Verfügung stehenden Probenahmeverfahren während einer Bestandsbeprobung zum Einsatz. Durch wiederholte Bestandsbeprobungen in verschiedenen Langzeitstudien beim Schwein und beim Geflügel lagen hinreichend Daten für statistische Auswertungen vor.

Für den MRSA Nachweis in der Tierumgebung beim Schwein wurden die signifikant höchsten Nachweishäufigkeiten mit der Sockentupferprobe erzielt. Für die sichere Status Erhebung im Bestand wird allerdings der Einsatz von 60 Nasentupfern mit anschließender Aufarbeitung in Fünfergruppen empfohlen. Es konnten deutliche Zusammenhänge zwischen der Anzahl MRSA positiver Tiere im Bestand und der Anzahl positiver Tierumgebungsproben festgestellt werden.

In Geflügelmastbetrieben wurden die höchsten Nachweishäufigkeiten auf Bestandesebene mit Haut- und Choanentupfern erzielt. Nur der Hauttupfer erreichte signifikant höhere Nachweisraten gegenüber der Sammelstaubprobe, die das empfindlichste Verfahren der Umgebungsbeprobung darstellte.

In Milchviehbeständen konnten MRSA positive Proben von Tieren und ihrer Umgebung nur vereinzelt gewonnen werden. Aufgrund der geringen Zahl an Bestandsbeprobungen in positiven Beständen waren statistische Betrachtungen nicht möglich.

Ein interessanter Aspekt waren Ergebnisse aus Verlaufsstudien beim Schwein, Geflügel und Rind, die zeigten, dass trotz eines MRSA Eintrages in einen Bestand offenbar keine weitere Ausbreitung des Keims stattfand. Die Befunde deuten an, dass eine Reihe ganz verschiedener Faktoren hemmend oder fördernd auf die Ausbreitung von MRSA in einer Herde wirken kann. Es wird vorgeschlagen, dass anhand der asservierten MRSA Isolate und mittels der umfangreich erhobenen Daten eine Risikoanalyse durchgeführt wird, die die Risikofaktoren für eine Verbreitung von MRSA in Tierbeständen eingehender untersucht.

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

Entsprechen den primären Vorgaben und Zielsetzungen wurden verschiedene qualitative und quantitative Probenahme- und Nachweisverfahren zur Detektion von MRSA entwickelt, in Nutztierbeständen eingesetzt und hinsichtlich ihrer Sensitivität getestet. Für Schweine und Mastgeflügel können standardisierbare Probenahmeverfahren zur Statuserhebung vorgeschlagen werden. Die Quantifizierung von MRSA aus Tiertupfern und Umgebungsproben ist optimiert worden und ermöglicht eine Einschätzung über die Belastung in der Tierumgebung. Auch in Rinderbetrieben schlugen verschiedenen Nachweisverfahren an, jedoch sollten zur Bewertung noch mehr Vergleichsuntersuchungen in MRSA positiven Beständen durchgeführt werden.

Der Einfluss des Erregernachweises (qualitativ und quantitativ) in Umgebungs- und Tierproben auf den Anteil MRSA positiver Tiere wurde in Schweinebeständen untersucht und Zusammenhänge konnten dargestellt werden. Die vom Projektträger mit der Aufgabenbeschreibung aufgestellten Hypothesen wurden für die Tierart Schwein überprüft bzw. beantwortet (siehe Kapitel 3.2.1). Für die anderen untersuchten Tierarten konnten diese Hypothesen nicht vollständig überprüft werden, da die Anzahl der vorgesehenen und durchgeführten Bestanduntersuchung für eine statistische Bewertung nicht ausreichend war.

Etwaige Einflüsse auf das Vorkommen unterschiedlicher MRSA Stämme in den untersuchten Beständen können nur gemeinsam mit dem BfR untersucht werden, da eine Typisierung der Stämme in den Teilprojekten des Verbundes nicht geplant war. Sämtliche MRSA Isolate aus den Bestandsbeprobungen wurden asserviert und die Daten zu den untersuchten Beständen wurden in Datenbanken gespeichert. Somit sind die Voraussetzung für weitere Untersuchungen, wie z.B. der Darstellung der Verbreitung spezifischer MRSA Typen oder einer Risikomodellierung, gegeben.

6. Literaturverzeichnis

Altman, D.G. Practical Statistics for Medical Research. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, 1991

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

Asoh, N., Masaki, H., Watanabe, H., Watanabe, K., Mitsusima, H., Matsumoto, K., Oishi, K. and Nagatake, T., 2005. Molecular characterization of the transmission between the colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to human and environmental contamination in geriatric long-term care wards. *Intern Med* 44 (1), 41-45.

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

Broens, E.M, Graat, E.A, Van Der Wolf, P.J, Van De Giessen, A.W, De Jong, M.C (2011): Prevalence and risk factor analysis of livestock associated MRSA-positive pig herds in The Netherlands. *Prev. Vet. Med.*102: 41-9

Clements, M.O. and Foster, S.J., 1999. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 7 (11), 458-462.

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

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

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

Förster, M., Klimpel, K. Mehlhorn, H., Sievert, K., Messler, S., Pfeffer, K., 2007. Pilot study on synanthropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. *Parasitol Res* 101, 243-246

Friedrich, A., Rau, J. Horlacher, S. Spohr, M. (2011): Verbreitung von Methicillin-resistenten Staphylokokken in Tankmilch und Mastitisproblemen aus Nord-Württemberg. Tierärztl. Umschau 66: 195-200

Friese, A., Schulz, J., Hoehle, L., Fetsch, A., Tenhagen, B.-A., Hartung, J., Roesler, U. February 2012, posting date. Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns, *Vet. Microbiol.* (2010), doi:10.1016/j.vetmic.2012.01.019

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

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

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

- Jensen, M.M., Downs, W.C., Morrey, J.D. Nicoll, T.R., Lefevre, S.D., Meyers, C.M. (1986): Staphylococcosis of Turkeys. 1. Portal of entry and tissue colonization. *Avian diseases* 31: 64-69
- Juhász-Kaszanyitzky, E., Janosi, S., Somogyi, P., Dan, A., van der Graaf-van Bloois, L., van Duijkeren, E. and Wagenaar, J.A., 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis* 13 (4), 630-632.
- Khanna, T., Friendship, R., Dewey, C. and Weese, J.S., 2008. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet.Microbiol.* 128 (3-4), 298-303.
- Kipp, F., Friedrich, A.W., Becker, K., Von Eiff, C., 2004. Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter *Staphylococcus-aureus*-Stämme. *Deutsches Ärzteblatt* 101: A 2045-A 2050
- Klevens, R.M., Morrison, M.A., Fridkin, S.K., Reingold, A., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L.H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J.M., Craig, A.S., Fosheim, G., McDougal, L.K. and Tenover, F.C., 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerg Infect Dis* 12 (12), 1991-1993.
- Kloos, W.E., Schleifer, K.H., Götz, F., 1992. The Genus *Staphylococcus*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. The prokaryotes Vol. II, Springer-Verlag, Berlin: 1369-1420
- Landonlo, J.J., 2000. *Staphylococcus*. In: Encyclopedia of Microbiology, Vol. 4, Second Edition, Academic Press
- Lee, J.H., 2006. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Vet Microbiol* 114 (1-2), 155-159
- Lighthart, B. and Mohr, A.J., 1987. Estimating downwind concentrations of viable airborne microorganisms in dynamic atmospheric conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1580-1583
- Loeffler, A., Boag, A.K., Sung, J., Lindsay, J.A., Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Smith, H., Stevens, K.B. and Lloyd, D.H., 2005. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J Antimicrob Chemother* 56 (4), 692-697.
- Meemken, D., Cuny, C., Witte, W., Eichler, U., Staudt, R. and Blaha, T., 2008. [Occurrence of MRSA in pigs and in humans involved in pig production--preliminary results of a study in the northwest of Germany]. *Dtsch.Tierarztl.Wochenschr.* 115 (4), 132-139.
- Moon, J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Joo, Y.S., Park, Y.H., Kim, M.N. and Koo, H.C., 2007. Antibioqram and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Dairy Sci* 90 (4), 1716-1724.
- Pu, S., Han, F. and Ge, B., 2008. Isolation and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Louisiana Retail Meats. *Appl Environ Microbiol.*
- Rountree, P.M., 1963. The Effect of Desiccation on the Viability of *Staphylococcus Aureus*. *J Hyg (Lond)* 61, 265-272.
- Saleh, M., 2006. Untersuchungen zur Luftqualität in verschiedenen Systemen der Geflügelhaltung mit besonderer Berücksichtigung von Staub und Luftkeimen. Dissertation am Lehrstuhl für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- Schulz, J., 2007. Zur Charakterisierung der Ausbreitungsentfernung von Bioaerosolen aus Masthühnerställen. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.

- Shimizu, A., Ozaki, J., Kawano, J., Saitoh, Y., Kimura, S. (1992): Distribution of staphylococcus species on animal skin. *J. Vet. Med. Sci.* 54 (2): 355-357
- Shiomori, T., Miyamoto, H. and Makishima, K., 2001. Significance of airborne transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an otolaryngology-head and neck surgery unit. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127 (6), 644-648.
- Sing, A., Tuschak, C. and Hormansdorfer, S., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a family and its pet cat. *N Engl J Med* 358 (11), 1200-1201.
- Thorne, P.S., Kiekhafer, M.S., Whitten, P., Donham, K.J., 1992. Comparison of bioaerosols sampling methods in barns housing swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2543-2551
- Van Den Broek, I., V. A. N. Cleef, B., Haenen, A., Broens, E.M., PJ, V.D.W., MJ, V.D.B., Huijsdens, X.W., Kluytmans, J.A., AW, V.D.G. and Tiemersma, E.W., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. *Epidemiol Infect*, 1-9.
- VWA, 2007. Prevalence of MRSA in meat: factsheet.
- Weese, J.S. and Rousseau, J., 2005. Attempted eradication of methicillin-resistant staphylococcus aureus colonisation in horses on two farms. *Equine Vet J* 37 (6), 510-514.
- Weese, J.S., 2007. Environmental surveillance for MRSA. *Methods in Molecular Biology* 391, 201-208
- Weese, J.S., Caldwell, F., Willey, B.M., Kreiswirth, B.N., McGeer, A., Rousseau, J. and Low, D.E., 2006. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. *Vet Microbiol* 114 (1-2), 160-164.
- Wenzel R.P., Nettleman, M.D., Jones, R.N., Pfaller, M.A., 1991. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Implications for the 1990s and Effective Control Measures. *The American Journal of Medicine* 91: 3B221S-3B227S
- Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C. and Cuny, C., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 13 (2), 255-258.
- Wulf, M., Markestein, A., Van der Linden, F., Vos, A., Klassen, C. and Verduin, C.M., 2008. First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. *Euro Surveill* 13 (9).
- Wulf, M.W., Sorum, M., van Nes, A., Skov, R., Melchers, W.J., Klaassen, C.H. and Voss, A., 2008a. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clin Microbiol Infect* 14 (1), 29-34.
- Wulf, M.W., Tiemersma, E., Kluytmans, J., Bogaers, D., Leenders, A.C., Jansen, M.W., Berkhout, J., Ruijters, E., Haverkate, D., Isken, M. and Voss, A., 2008b. MRSA carriage in healthcare personnel in contact with farm animals. *J Hosp Infect* 70 (2), 186-190.