

Untersuchungen zum Vorkommen von Staphylokokken in einem Milchvieh-Bestand

Hala Salam ^{1,2}, Fawzy El Seedy ², Karin Klengel ³, Stefan Monecke ⁴, Ralf Ehrlich ⁵, Herbert Tomaso ¹, Helmut Hotzel ¹

¹ Friedrich-Loeffler-Institut - Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Jena

² Beni Suef University, Beni Suef, Ägypten

³ Tiergesundheitsdienst Thüringen, Jena

⁴ Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, TU Dresden, Dresden

⁵ Alere Technologies GmbH, Jena

Einführung

Staphylococcus (S.) aureus ist einer der häufigsten Mastitis-Erreger bei Kühen. Die ökonomischen Verluste in den USA allein durch subklinisch verlaufende bovine Mastitis werden auf jährlich 1 Milliarde US \$ geschätzt. Die verstärkt auftretende Resistenz von *S. aureus*-Stämmen gegen verschiedene Antibiotika ist ebenfalls problematisch.

Beim Menschen wurde *S. aureus* u. a. als Ursache für Pneumonien, nekrotisierende Fasziitis, Septikämie und Haut- bzw. Weichteilinfektionen beschrieben. Humane Lebensmittelintoxikationen können ebenfalls durch diesen Mikroorganismus hervorgerufen werden, wobei die eigentliche Ursache von *S. aureus* gebildete, hitzestabile Enterotoxine darstellen.

Bei epidemiologischen Untersuchungen zum Vorkommen von *S. aureus* bei Tier und Mensch wurden in der Vergangenheit verschiedene molekularbiologische Methoden wie Multilocus-Enzymelektrophorese, „Restriction-Fragment-Length-Polymorphism“(RFLP)-Analyse und Pulsfeld-Gelelektrophorese angewandt. Obwohl diese Methoden hochgradig diskriminatorisch sind, gestaltet sich ein Vergleich der Ergebnisse innerhalb verschiedener Labors schwierig. Auswege bieten Methoden wie DNA-Sequenzierung bestimmter Gen-Loci, „Multi-Locus-Sequence-Typing“ (MLST) und die Mikroarray-Technologie. Mit diesen Methoden sind auch Übertragungswege von *S. aureus*-Isolaten von Mensch auf Tiere und umgekehrt nachverfolgbar. Mit dem hier verwendeten Mikroarray-System können über 330 Sequenzen von *S. aureus*, welche 180 verschiedene Gene und Allele davon repräsentieren, detektiert werden.

Ziel dieser Studie waren die Charakterisierung und der Vergleich von *S. aureus*-Isolaten, welche aus Kuhmilch angezüchtet wurden, und denen, die vom Betreuungspersonal der Rinderherde stammten. Damit sollte die Frage nach einer möglichen Übertragung des Mikroorganismus zwischen Mensch und Tier beantwortet werden. Ein wichtiger Bestandteil war ebenso die Frage nach dem Vorkommen Lebensmittel-relevanter Enterotoxine in der Milch dieser Herde.

Material und Methoden

Untersucht wurde ein Milchvieh-Bestand von 500 Milchkuhen, der in der Vergangenheit von Mastitisproblemen betroffen war.

Ende 2008 wurden Milchproben (n=475) des gesamten Bestandes gesammelt. Vom Betreuungspersonal der Herde (Melker, Tierarzt, aber auch Verwaltung) wurden Nasentupfer genommen (n=19). Weiterhin wurden Umwelt- (n=51) und Luftproben (n=3) gesammelt.

10 µl der Milchproben wurde auf Columbia-Blutagar (Oxoid, Wesel), welcher 5% bovine Erythrozyten enthielt, ausgebracht und 24 h bei 37°C inkubiert. Die Tupferproben wurden in 200 µl sterilem PBS gediluiert und nach Entfernen des Tüpfers wurden 10 µl auf Columbia-Blutagar-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden ebenfalls 24 h bei 37°C inkubiert.

Katalase- und Koagulase-Test wurden nach Standard-Prozeduren durchgeführt.

Staphylococcus-verdächtige Kolonien wurden auf Baird-Parker-Agar (Oxoid) subkultiviert.

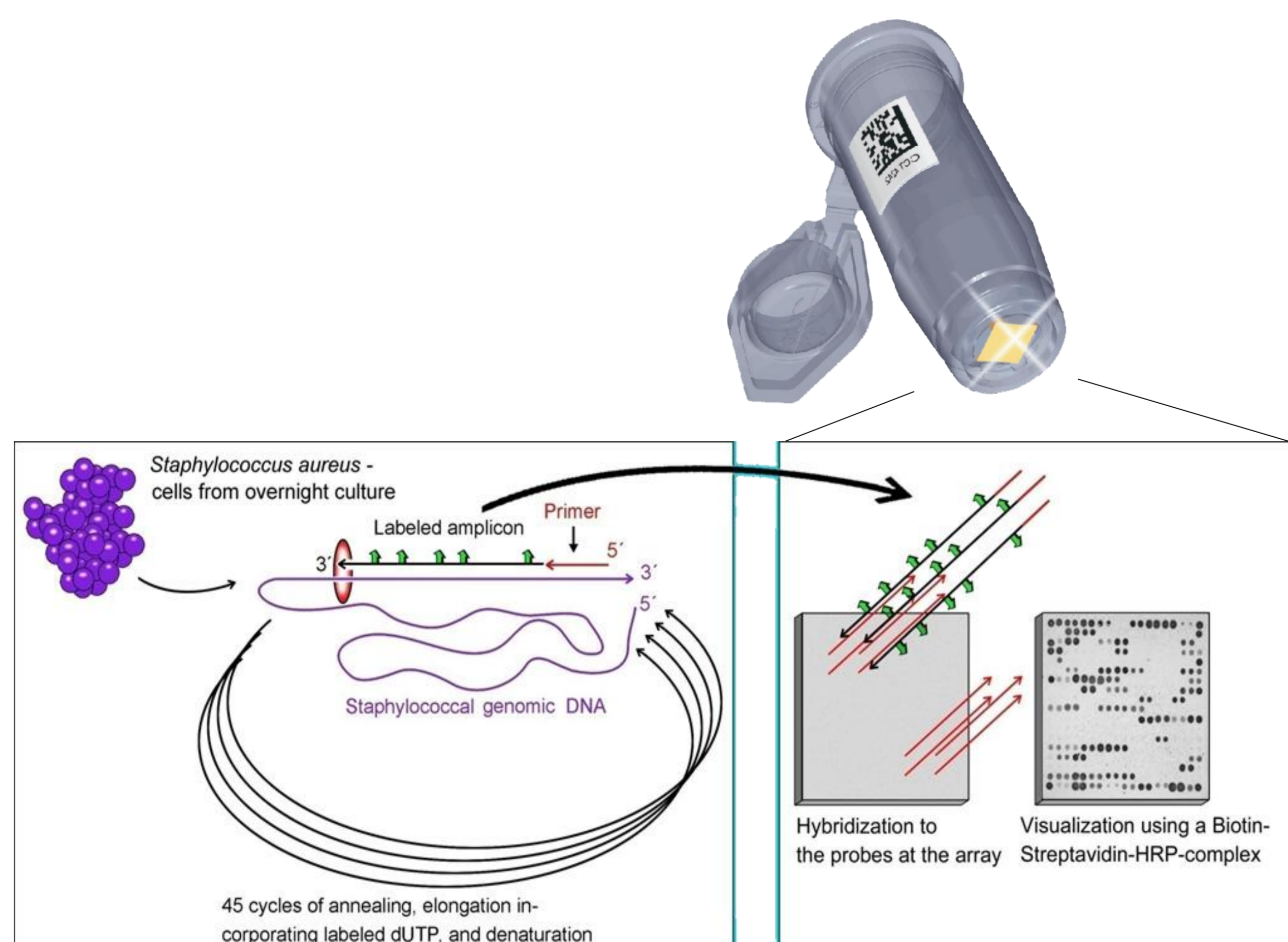


Abb. 1: Mikroarray-Untersuchungen von *Staphylococcus aureus*

Die Extraktion der DNA der *Staphylococcus*-Isolate wurde nach Lyse mit einem Puffer, der Lysostaphin, Lysozym und Ribonuklease A enthielt, mit dem „DNeasy Blood and Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Die Mikroarray-Analysen wurden mit dem ArrayTube™-System durchgeführt (Alere Technologies, Jena). Die Biotin-Markierung der genomischen DNA und die anschließende Hybridisierung an die gespotteten *S. aureus*-spezifischen Sonden wurde mehrfach beschrieben (1, 2). Die Sichtbarmachung der positiven Hybridisierungssignale erfolgte durch Streptavidin-HRP-vermittelte Präzipitation des chromogenen Substrates Seramun Green (Seramun, Woizig).

Die Prozedur ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Die DNA-Sequenzierung von nicht-*S. aureus*-Isolaten erfolgte nach Amplifikation der 16S-rRNA-Gene mit den Primern 16SUNI-L/R (3) über „Cycle Sequencing“ mit dem BigDye Terminator 1.1v Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Sequenzierungsprodukte wurden mit dem ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) analysiert.

Ergebnisse

Aus den 475 Milchproben wurden 23 *S. aureus*-Isolate (4,8%) angezüchtet. Keines dieser Isolate stellte einen MRSA dar; Resistenzgene gegen Antibiotika konnten ebenso wenig detektiert werden.

Virulenz-Marker wie Leukozidin *lukM* bzw. PVL oder das „toxic shock syndrom toxin“ (*tst1*) konnten nicht nachgewiesen werden.

Alle aus der Milch isolierten *S. aureus*-Stämme gehörten einem *agr*-Typ (*agrIII*) und dem klonalen Cluster CC1-MSSA an.

Wenigstens ein Enterotoxin-Gen konnte in allen Isolaten nachgewiesen werden (Abb. 2).

14 *Staphylococcus*-Isolate, darunter 4 *S. aureus*, wurden aus den Nasentupfern des Betreuungspersonals kultiviert. Die anderen Staphylokokken wurden durch DNA-Sequenzierung als *S. epidermidis* (8x), *S. saprophyticus* (1x) und *S. haemolyticus* (1x) identifiziert.

Die humanen *S. aureus* gehörten alle zum *agr*-Typ I; drei Isolate waren CC45-MSSA, ein anderes stellte einen Vertreter von ST7-MSSA dar.

Kein *S. aureus* konnte aus den Umwelt- und Luftproben kultiviert werden. Allerdings wurden verschiedene andere *Staphylococcus*-Spezies identifiziert: *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* und *S. xylosus*.

Source of <i>S. aureus</i> (number of isolates)	<i>agr</i> group	Strain assignment	Toxin gene setting			
			<i>seh</i>	<i>sea</i> <i>seh</i>	<i>sea</i> <i>etb</i>	<i>sea</i> <i>seh</i> <i>etb</i>
Milkers (2) and veterinarian (1)	<i>agrI</i>	CC45-MSSA	-	-	-	-
Milker (1)	<i>agrI</i>	ST7-MSSA	-	-	-	-
Cattle (23)	<i>agrIII</i>	CC1-MSSA	7	13	2	1

Abb. 2: Charakterisierung der *S. aureus*-Isolate und ihre Toxin-Genausstattung

Diskussion

Die Mikroarray-Technologie und die DNA-Sequenzierung erlaubten eine gründliche Identifizierung und Charakterisierung der kulturell angezüchteten Staphylokokken-Isolate einer Milchvieh-Herde und ihres Betreuungspersonals.

Dabei wurde festgestellt, dass sich die humanen und bovinen Isolate von *S. aureus* hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten klonalen Clustern und des *agr*-Typs eindeutig unterscheiden. Es kann damit davon ausgegangen werden, dass in diesem Betrieb eine Übertragung von Mensch auf Tier oder umgekehrt nicht stattgefunden hat.

MRSA-Stämme wurden in dieser Untersuchung nicht gefunden.

Die bovinen *S. aureus*-Isolate trugen alle Enterotoxin-Gene, was für das Lebensmittel Milch von Bedeutung sein kann, weil deren hitzestabile Expressionsprodukte eine Ursache für humane Lebensmittelintoxikationen sein können.

Die Untersuchungen zur Charakterisierung von MSSA-Stämmen zeigten den Wert der Anwendung der Mikroarray-Technologie für die Praxis. Meist werden MSSA-Isolate nicht betrachtet, da sie bei Tests auf MRSA unter Verwendung spezieller Selektivmedien nicht wachsen und somit weitergehenden Untersuchungen entzogen werden.

Literatur

- (1) S. Monecke, R. Ehrlich „Rapid genotyping of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays“, Clin. Microbiol. Infect. 11, 825-833, 2005.
- (2) S. Monecke, P. Slickers, H. Hotzel, G. Richter-Huhn, M. Pohle, S. Weber, W. Witte, R. Ehrlich „Microarray-based characterisation of a Pantone-Valentine leukocidin-positive community-acquired strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*“, Clin. Microbiol. Infect. 12, 718-728, 2006.
- (3) P. Kuhnert, S. E. Capaul, J. Nicolet, F. Frey „Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA gene sequences“, Int. J. System. Bacteriol. 46, 1174-1176, 1996.