



Year: 2020

Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb

Honegger, J ; Lehnherr, H ; Bachofen, Claudia ; Stephan, Roger ; Sidler, Xaver

Abstract: In recent years, Livestock Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) are found frequently in pigs. The colonization of the care staff with LA-MRSA is strongly associated with the intensity and duration of animal contact and LA-MRSA herd prevalence. In human medicine, staphylococcal infections have been controlled successfully by topical or systemic administration of *Staphylococcus* - associated bacteriophages. Therefore, the present study investigated the effect of a bacteriophage cocktail on skin and mucosal colonization of pigs with MRSA in a pig farm with high MRSA prevalence. In a first experiment, the sows were washed with a bacteriophage cocktail and nose, mouth and vagina were rinsed before the sows were admitted to the farrowing house. Then, 10 ml of the bacteriophage cocktail was administered daily to the sows over the feed until weaning. The suckling piglets were sprayed and sampled twice a week during the suckling period and treated with the bacteriophage cocktail over the feed during the weaning period. In further experiments, the weaning room was nebulized three times a day with a bacteriophage cocktail and different concentrations of bacteriophages were added to the drinking water via Dosatron®. None of the experiments, however, showed an eradication of MRSA neither in nose nor in feces.

DOI: <https://doi.org/10.17236/sat00259>

Other titles: Field trial for eradication of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pig breeding farm by bacteriophages

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-187644>

Journal Article

Published Version

Originally published at:

Honegger, J; Lehnherr, H; Bachofen, Claudia; Stephan, Roger; Sidler, Xaver (2020). Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 162(5):307-317.

DOI: <https://doi.org/10.17236/sat00259>

Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb

J. Honegger¹, H. Lehnherr², C. Bachofen³, R. Stephan⁴, X. Sidler¹

¹Departement Nutztiere, Abteilung Schweinemedizin, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich; ²PTC Phage Technology Center GmbH; ³Institut für Virologie, Vetsuisse Fakultät Zürich; ⁴Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich

Zusammenfassung

Nutztier assoziierte Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) werden in den letzten Jahren häufig bei Schweinen nachgewiesen. Die Kolonisation des Betreuungspersonals mit LA-MRSA korreliert stark mit der Intensität und der Dauer des Tierkontaktes sowie der LA-MRSA-Herdenprävalenz. In der Humanmedizin konnten Staphylokokken-Infektionen durch topische oder systemische Verabreichung von Staphylokokken-spezifischen Bakteriophagen erfolgreich bekämpft werden. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie der Effekt des Einsatzes eines Bakteriophagencocktails auf die Besiedelung der Haut und Schleimhaut der Schweine mit MRSA in einem Schweinezuchtbetrieb mit hoher MRSA-Prävalenz untersucht. In einem ersten Versuch wurden die Sauen vor dem Einstellen in den Abferkelstall mit einem Staphylokokken-Bakteriophagencocktail gewaschen und Maul, Nase und Vagina gespült. Danach wurden 10 ml eines Phagencocktails den Sauen täglich bis zum Absetzen übers Futter verabreicht. Die Saugferkel wurden während der Sägezeit zweimal wöchentlich besprüht und beprobt und während der Absetzphase übers Futter mit dem Bakteriophagencocktail behandelt. In weiteren Versuchen wurde im Absetzraum dreimal täglich ein Bakteriophagencocktail vernebelt sowie die Bakteriophagen in verschiedenen Dosierungen zusätzlich via Dosatron® dem Tränkwasser zugefügt. In keinem der Versuche konnte eine Eradikation der MRSA in Nase oder Kot festgestellt werden.

Schlüsselwörter: Bakteriophagen, Eradikation, Kolonisationsprävalenz, MRSA ST398, Schwein

Field trial for eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pig breeding farm by bacteriophages

In recent years, Livestock Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) are found frequently in pigs. The colonization of the care staff with LA-MRSA is strongly associated with the intensity and duration of animal contact and LA-MRSA herd prevalence. In human medicine, staphylococcal infections have been controlled successfully by topical or systemic administration of *Staphylococcus* – associated bacteriophages. Therefore, the present study investigated the effect of a bacteriophage cocktail on skin and mucosal colonization of pigs with MRSA in a pig farm with high MRSA prevalence. In a first experiment, the sows were washed with a bacteriophage cocktail and nose, mouth and vagina were rinsed before the sows were admitted to the farrowing house. Then, 10 ml of the bacteriophage cocktail was administered daily to the sows over the feed until weaning. The suckling piglets were sprayed and sampled twice a week during the suckling period and treated with the bacteriophage cocktail over the feed during the weaning period. In further experiments, the weaning room was nebulized three times a day with a bacteriophage cocktail and different concentrations of bacteriophages were added to the drinking water via Dosatron®. None of the experiments, however, showed an eradication of MRSA neither in nose nor in feces.

Keywords: bacteriophages, colonization prevalence, eradication, MRSA ST398, pig

<https://doi.org/10.17236/sat00259>

Eingereicht: 15.11.2019
Angenommen: 14.02.2020

Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb

X. Sidler et al.

Einleitung

Staphylococcus (S.) aureus, welche als normale Besiedler der Haut und Schleimhaut über ein grosses Spektrum an Virulenzfaktoren verfügen,⁴⁵ können sowohl in der Human- wie auch in der Veterinärmedizin schwierig zu bekämpfende Infektionskrankheiten sowie Lebensmittelintoxikationen verursachen.^{30,34} Als Folge eines intensiven Antibiotikaeinsatzes entwickelten sich Resistenzen gegen zahlreiche Antibiotika und führten weltweit zu einer starken Verbreitung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus (S.) aureus* (MRSA), sodass antibiotische Behandlungen immer schwieriger werden.⁷¹ Auf der Suche nach Alternativen wurde der Einsatz von Bakteriophagen, welche 1917 erstmals erfolgreich zur Behandlung von Dysenterie beim Menschen eingesetzt wurden, wieder entdeckt.²⁰

Bakteriophagen sind Viren, welche die Eigenschaft haben, sich nur in Bakterien zu vermehren. Ihre Anzahl in der Biosphäre wird auf 10^{30} – 10^{31} geschätzt,²⁵ also rund 10-mal mehr als Bakterien.² Zudem sind sie ein natürlicher Bestandteil des menschlichen Mikrobioms und daher grundsätzlich gut für die Therapie von bakteriellen Infekten⁴⁷ oder zur Bekämpfung multiresistenter Keime⁶⁹ geeignet. Eine erfolgreiche Phagentherapie erfordert eine Interaktion des Phagen mit den Bakterien, welche zu einer Adsorption des Phagen an das Wirtsbakterium führt, gefolgt von einer Injektion der Phagen-DNA in die Zelle, einem Phagenreplikationszyklus mit anschliessender Zelllyse und der Freisetzung mehrerer Phagenvirionen.¹¹ Da Phagen nur an ganz spezifische Zucker an der Oberfläche eines Wirtsbakterium adhären können, wird zur Verbesserung der Wirksamkeit und zur Resistenzminimierung in der Regel ein Bakteriophagencocktail eingesetzt.¹¹

In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits der positive Effekt des Einsatzes von Bakteriophagen zur Bekämpfung von Colidiarrhoe beim Kalb,⁵³ der Colibazilliose beim Geflügel,²⁷ zur Reduktion der Darmbesiedelung mit *S. typhimurium* beim Schwein^{12,66} oder zur Leistungsförderung beim Schwein^{32,73} gezeigt werden. Nach einer intranasalen Applikation von 10^7 MRSA Kolonie bildenden Einheiten/ml bei Mäusen führte eine kombinierte Therapie von Mupirocin und einer zweimaligen intranasalen Instillation von 50 Mikroliter einer Bakteriophagenlösung mit 10^7 PFU/ml (plaque forming units per milliliter) zu einer signifikanten Reduktion von MRSA innerhalb von 2 Tagen, wobei mit der alleinigen Phagentherapie nach 12 Tagen eine Reduktion der experimentell verabreichten MRSA um ca. 5.5 log-Stufen erreicht werden konnte.¹⁵

Auch in der Humanmedizin wurden Bakteriophagen oder Bakteriophagencocktails zur Behandlung von Os-

teomyelitis, Peritonitis, Wundinfekten bei Diabetes-Patienten, Pneumonien, Septikämien oder Harnwegs-entzündungen, welche durch antibiotikaresistente *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* oder *Proteus spp.* verursacht wurden, mit Erfolg und ohne Neben- effekte eingesetzt.^{41,42,48,54,68}

In der Lebensmittelindustrie werden heute Bakteriophagen zur Kontrolle von *Listeria (L.) monocytogenes* in „convenience food“²¹ oder zur Kontrolle von *Escherichia (E.) coli* O157:H7 und *Salmonella (S.) enterica* in erhitzten Fleischwaren eingesetzt.^{6,44}

Im Jahre 2005 wurden erstmalig „livestock-associated“ MRSA (LA-MRSA) ST398 sowohl bei Schweinen als auch bei Menschen isoliert.⁶⁴ Mittlerweile können vor allem bei Nutztieren LA-MRSA isoliert werden.^{19,24,28,31,40,52,59,65} In Deutschland sind über 75% der Schweinehalter und etwa 4–5% ihrer Familienmitglieder mit LA-MRSA kolonisiert.¹⁸ Intensität und Dauer des Tierkontaktes sowie die MRSA-Herdenprävalenz sind sehr stark mit der LA-MRSA Kolonisation des Menschen assoziiert.^{23,36,57,58} LA-MRSA sind Haut- und Schleimhautbesiedler und können bei Schweinen sowohl horizontal, durch direkten Tier-zu-Tier-Kontakt, und vertikal, wie auch indirekt übertragen werden.¹⁷ Der Zukauf von MRSA-positiven Schweinen in negative Zucht- oder Mastbetriebe, eine hohe Tierdichte, grosse Tierherden, der Kolonisationsstatus der Muttersau, der Einsatz von Zinkoxyd oder Desinfektionsmitteln, sowie ein häufiger Antibiotikaeinsatz werden als Risikofaktoren für die Besiedelung der Schweine mit LA-MRSA beschrieben.^{4,7–10,18,19,49,56,59,62,70} Ebenso können Vektoren wie Personen, Haus-, Nage- und Nutztiere sowie Pferde zur Verteilung von LA-MRSA beitragen.¹⁷ Auch in Staub oder in der Luft innerhalb und ausserhalb des Stalles, in Futtertrögen und Wassertränken sowie im Kot und an Buchtenwänden können MRSA nachgewiesen werden und sind somit eine Kontaminationsquelle.^{3,22,50,62}

In der Schweiz wurden im Jahr 2009 zum ersten Mal MRSA ST398 aus Nasentupfern von Schlachtschweinen isoliert.²⁶ Seither nahm die Kolonisationsprävalenz von 2% im Jahre 2009 auf rund 26.5% im Jahre 2014 zu, obwohl der Antibiotikaverbrauch im gleichen Zeitraum um 28% abgenommen hat.¹ Diese Zunahme der MRSA ST398 Prävalenz ist in erster Linie auf den uneingeschränkten Handel von kolonisierten Tieren zurückzuführen. So konnte gezeigt werden, dass während des Transportes auf einem MRSA-frei getesteten Doppelstock-LKW, wo MRSA-positive Schweine auf der oberen und MRSA-negative Schweine auf der unteren Etage geladen waren, nach einer einstündigen Fahrt in den Schlachthof 20% der MRSA-negativen Schweine mit MRSA in der Nase kolonisiert wurden.⁵ Über Mass-

nahmen zur Reduktion von MRSA in Schweineställen sind bisher wenige Studien publiziert. Alleiniges Waschen trächtiger Sauen vor dem Umställen in den Abferkelstall trug nicht zur Reduktion von MRSA bei.⁶¹ Waschen mit Shampoo oder Desinfektionsmittellösungen aus Chlorhexidine-Diglukonat und Isopropanol führte zwar zu einer signifikanten Reduktion der MRSA-Kolonisation, jedoch war der Erfolg nur von kurzer Dauer.⁴⁶

Der Handel mit MRSA kolonisierten Schweinen ist ein grosses Risiko für die Verbreitung von LA-MRSA. Deshalb wurden in dieser Arbeit in einem Schweinebetrieb mit hoher MRSA-Kolonisationsprävalenz bei Muttersauen, Saug- und Absetzferkel MRSA-assoziierte Bakteriophagen eingesetzt und der Kolonisierungsstatus der Sauen (Nase, Vagina, Rektum, Zitzenhaut) während der Säugezeit sowie deren Ferkel (Nase, Rektum) regelmässig bis zum Verkauf in die Mast untersucht. Ziel war es, verschiedene Applikationsformen eines MRSA-Bakteriophagencocktails zu testen, um nicht nur eine MRSA-Reduktion, sondern eine komplette Dekolonisierung der Mastferkel bis zum Verkauf in die Mast zu erreichen.

Material und Methoden

Die Studie wurde gemäss den ethischen Richtlinien der Universität Zürich und der Vorgaben des Schweizerischen Tierschutzgesetzes (Tierversuchsbewilligung ZH 037/16) durchgeführt.

Betriebsauswahl

Die Feldstudie wurde in einem geschlossenen Zucht-Mastbetrieb mit einer MRSA-Kolonisationsprävalenz von 50–90% in den verschiedenen Alterskategorien durchgeführt.⁵ Der Betrieb hatte 100 Muttersauen-, 320 Absetz- und 200 Aufzuchtplätze. Im 3-Wochen-Rhythmus ferkelten jeweils 10–14 Sauen ab und die Ferkel wurden nach durchschnittlich 28-tägiger Säugezeit abgesetzt. Die abgesetzten Ferkel wurden in einen sauber gereinigten und nicht regelmässig desinfizierten Ferkelaufzuchtbereich umgestallt und die nicht zur Nachzucht selektionierten Tiere wurden im Alter von 9–10 Wochen an einen Mäster verkauft.

Bakteriophagen-Herstellung

Der verwendete Phagencocktail wurde im Phagen Technologie Center (PTC), Bönen, Deutschland hergestellt. Dieser gegen *S. aureus* wirkende Phagencocktail bestand aus zwei genetisch unabhängigen Bakteriophagen, STA1 (Myoviridae) und EB1 (Podoviridae), beides Eigenisolate des PTC. STA1 stammt aus der Abwasserreinigungsanlage der Stadt Hamm, EB1 stammt aus Schweinekot aus einem Absetzferkelstall in Nordrhein-Westfalen.

Beide Bakteriophagen wurden jeweils auf verschiedenen Wirtsstämmen propagiert, um den Wirtsbereich des Cocktails zu erweitern. Bei den Wirtsstämmen handelte es sich um *S. aureus* Stamm 11, welcher als CC398 typisiert und aus Mastitismilch einer Kuh isoliert wurde, sowie Stamm 27, welcher zum klonalen Komplex CC479 gehört und ebenfalls aus Mastitismilch einer Kuh isoliert wurde, sowie Stamm 29, ein Humanisolat des klonalen Komplexes CC22 und Stamm 107, welcher aus einem Versuchsbetrieb des PTC stammte.

Der Phagencocktail war zusammengesetzt aus STA1.ST27; STA1.ST29; EB1.ST11 und EB1.ST107. Die vier Komponenten wurden einzeln hergestellt. Dazu wurde ein 100 Liter Fermenter mit 100 Liter steriler Nährlösung befüllt und mit einer Übernachtskultur beimpft. Die Bakterien wurden bei 37 °C unter Zuführung von Sauerstoff und konstantem Rühren bis zu einer Zelldichte von etwa 2×10^8 KBE/ml angezüchtet. Unter diesen Bedingungen vermehrten sich die Staphylokokken exponentiell und lieferten die Grundlage für eine optimale Vermehrung der Bakteriophagen. Die Bakteriophagen wurden dann mit einer MOI (multiplicity of infection) von 5 zugegeben. Damit wurden gemäss Poissonverteilung etwa 99% der Bakterien durch mindestens ein Bakteriophagen infiziert. Infizierte Bakterien stellten ihr Wachstum ein und produzierten stattdessen Bakteriophagen. Nach etwa einer Stunde Inkubation lysierten die Bakterienzellen und entliessen die Phagen ins Nährmedium, aus dem sie in einem mehrstufigen Filtrationsverfahren gewonnen und gereinigt wurden.² Als Endprodukt entstand ein Intermediat mit einer Konzentration von etwa 5×10^9 PFU/ml (plaque forming units per milliliter), welches in PBS (phosphate buffered saline) gepuffert wurde. Die oben beschriebenen vier Komponenten wurden dann im Verhältnis 1:1:1:1 zum fertigen Cocktail gemischt. Der Cocktail wurde *in vitro* auf seine Wirksamkeit gegen zwanzig MRSA-Isolate aus Schweinemastbetrieben, darunter elf Isolate aus dem Versuchsbetrieb, getestet und zeigte eine 95%-ige Abdeckung gegen diese 20 Isolate sowie eine 100%-ige Abdeckung gegen die Isolate aus dem Versuchsbetrieb. Nach mehrmaliger Überprüfung der Bakteriophagenkonzentration während des Feldversuches wurde festgestellt, dass die Bakteriophagenkonzentration pro Woche um eine log-Stufe abnahm. Deshalb wurde eine neue Charge mit erhöhter Phagenkonzentration von 10^{10} PFU/ml und anderer Pufferung hergestellt. Diese Charge wurde im zweiten und dritten Umtrieb eingesetzt und wöchentlich mittels Titrierung auf die Stabilität überprüft. In der neuen Charge konnte die Bakteriophagenkonzentration während der gesamten Versuchsphase in den ungeöffneten Versuchsgebunden (20 Liter-Kanister) konstant zwischen 10^9 – 10^{10} PFU/ml gehalten werden.

Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb

X. Sidler et al.

Feldversuch zur
Eradikation von
Methicillin-resistenten
Staphylococcus aureus
(MRSA) mittels
Bakteriophagen in einem
Schweinezuchtbetrieb

X. Sidler et al.

Probenverarbeitung im Labor

Zur kulturellen Anzucht von MRSA wurde ein zweistufiges Anreicherungsverfahren durchgeführt. Zu jedem Tupfer wurde Müller-Hinton-Broth mit 6.5% NaCl hinzugefügt und bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 1 ml der inkubierten Bouillon zu 5 ml Trypton-Soja-Broth mit Zusatz von 75 mg/l Aztreonam und 3.5 mg/l Cefoxitin gegeben und erneut für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Danach wurde diese Bouillon mit einer Einmalöse auf MRSA2-Platten (Oxoid, Basel, Schweiz) ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Vorgehen Umtrieb 1

Zur Eruiierung des MRSA-Status der Muttersauen im Betrieb wurden bei einer ersten Probenentnahme alle 99 Muttersauen auf das Vorkommen von MRSA untersucht. Die nächste Probenentnahme erfolgte eine Woche vor dem Abferkeln bei 14 Sauen einer Abferkelgruppe (sieben MRSA-positive und sieben MRSA-negative Sauen). Die 14 Sauen wurden rund eine Woche vor der Geburt nach dem Zufallsprinzip in 7 m² grosse Abferkelbuchten mit einem 80%-igen Festbodenanteil eines gereinigten und desinfizierten Abferkelstalls eingestallt. Die Muttersauen und die Saugferkel befanden sich in einem gemeinsamen Luftraum, waren aber durch 110 cm hohe Trennwände voneinander getrennt, sodass weder Muttersau noch Saugferkel direkten Kontakt hatten. Von den Muttersauen wurde jeweils ein Nasen-, Rektal-, Vaginal- und Zitzenhauttupfer entnommen. Für die Zitzenhaut wurden sterile Tupfer mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet und das Gesäuge damit abgestrichen. Zusätzlich wurden nach der Beprobung der Tiere auch Umgebungsproben von der Buchtenwand, der Kotplatte, dem Futtertrog und vom Ferkelnest entnommen. Für diese Proben wurden sterile Tupfer mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet und über die Flächen gestrichen. Ferkel von drei zufällig ausgewählten MRSA-positiven und drei MRSA-negative Sauen wurden zweimal wöchentlich während der Säugezeit bis zum Absetzen am 28. Tag resp. bis zum Verkauf in die Mast in der 9./10. Lebenswoche mittels Nasen- und Rektaltupfern beprobt. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme in sterile Plastikbeutel verpackt, in einer mit Kühlelementen enthaltenden Styroporbox ins Labor transportiert und innerhalb von 2 Stunden nach der Entnahme im Labor weiterbearbeitet.

Bakteriophagenverabreichung bei MRSA-positiven Muttersauen und deren Saug- und Absetzferkel (Umtrieb 1)

Beim ersten Umtrieb erhielten alle sieben MRSA-positiven Muttersauen zwei Wochen vor der Geburt bis zum Absetzen bei der Morgenfütterung 10 ml des Bakteriophagencocktails übers Futter verabreicht. Eine Woche vor der Geburt wurden die MRSA-positiven wie auch

die MRSA-negative Sauen mit dem Hochdruckreiniger gewaschen und bei den positiven Sauen wurden zusätzlich Maul, Nase und Vagina mit der 1:1000 verdünnten Bakteriophagenlösung gespült sowie die Hautoberfläche mit einem Handsprühgerät mit der Bakteriophagenlösung eingesprüht. Während der Säugezeit wurden die MRSA-positiven Sauen und deren Ferkel nach jeder Probenentnahme zweimal wöchentlich mit dem Bakteriophagencocktail eingesprüht. Zusätzlich wurde den Ferkeln ab dem vierten Lebenstag Starter- bzw. Ferkelfutter ad libitum angeboten, bei welchem nach dem Hygienisierungsprozess in der Futtermühle zehn Liter Bakteriophagenlösung/1000 kg Futter auf das Futter aufgesprüht wurde. Die abgesetzten Ferkel von MRSA-positiven Sauen wurden auch während der Absetzphase wöchentlich mit dem Bakteriophagencocktail besprüht und erhielten bakteriophagenhaltiges Futter (10 L/1000 kg Futter) ad libitum. MRSA-negative Muttersauen und deren Saug- und Absetzferkel wurden nie mit Phagen behandelt und erhielten auch kein bakteriophagenhaltiges Futter.

Bakteriophagenverabreichung bei Absetzferkeln (Umtrieb 2 und 3)

In den folgenden zwei Umtrieben wurden insgesamt 96 Absetzferkel, (26 MRSA-positive und 70 MRSA-negative Ferkel) in einen gründlich gereinigten und kontrolliert MRSA-freien Absonderungsstall eingestallt. MRSA-positive und MRSA-negative Ferkel waren durch Buchtenwände getrennt, sodass kein direkter Kontakt zwischen den Gruppen möglich war. Einige Tage vor dem Einstellen bis zum Verkauf der Absetzferkel in die Mast in der 9./10. Lebenswoche wurden wöchentlich aus jeder Bucht 12 Wischproben von Kotplatte (2), Boden (1), Liegenest (2), Wände, Decken, Lüftung, Futtertrog (2) und Tränkestellen (2) entnommen und auf MRSA untersucht. Die Bakteriophagen wurden im zweiten Umtrieb mittels Dosatron® in einer Konzentration von 0.3% und im dritten Umtrieb in einer Konzentration von 3% dem Trinkwasser zugemischt. Zusätzlich wurde der circa 30 m³ grosse Versuchsraum inklusive Liegebuchten in beiden Umtrieben dreimal täglich während je 15 Minuten mit einer „ZELJET Trolley“ Vernebelungs-Anlage mit insgesamt ca. 2.5 Liter Bakteriophagencocktail vernebelt. In beiden Umtrieben waren die Ferkel bei Versuchsbeginn durchschnittlich 28 Tagen alt und alle Versuchsferkel wurden einmal wöchentlich bis zum Verkauf in die Mast in der 9./10. Lebenswoche beprobt.

PCR-Nachweis der Bakteriophagen

Aus fünf Umgebungsstüpfen, welche am Ende des Versuchs entnommen wurden (Ferkelnest-Deckel, Buchtenwand, Deckeninstallationen, Fenster und Kotplatte), wurde am Virologischen Institut der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich DNA isoliert (Qiagen DNA mini

kit) und diese mittels PCR auf die Anwesenheit von STA1 und EB1 DNA getestet. Die Primersequenzen wurden vom PTC zur Verfügung gestellt und waren spezifisch für die eingesetzten Phagen.

Resultate

Die MRSA-Kolonisationsprävalenz der Muttersauen betrug bei der ersten Probenentnahme 44%. Beim Einstellen der 14 Muttersauen in den Abferkelstall, eine Woche vor dem Abferkeltermin, bestand die Versuchsgruppe aus sieben MRSA-positiven und sieben MRSA-negativen Muttersauen. Von den sieben MRSA-negativen Sauen behielten drei ihren negativen MRSA-Status während der gesamten Säugezeit, während die Schleimhäute der anderen vier mit MRSA kolonisiert wurden. Eine Sau, welche zu Beginn der Säugezeit MRSA-positiv war, wurde im Verlaufe der Säugezeit MRSA-negativ (Nasen-, Rektum-, Vaginaltupfer und Zitzenhaut MRSA-frei), so dass am Ende der Säugezeit zehn Sauen MRSA-positiv und vier Sauen MRSA-negativ waren. Während der Säugezeit änderte sich der MRSA-Status der ursprünglich positiven Muttersauen ständig, wobei die Nachweisstellen von MRSA variabel waren (Nase,

Rektum, Vagina, Zitzenhaut). Der Kolonisierungsstatus und die Nachweisstellen der sechs Muttersauen, deren Ferkel bis zum Verkauf in die Mast verfolgt wurden, sind in Tabelle 1A dargestellt.

Von den 36 Saugferkeln der drei MRSA-positiven Sauen waren wenige Tage nach der Geburt 33 mit MRSA kolonisiert und nur drei wiesen einen negativen MRSA-Status auf (Tab. 1B). Neun Saugferkel waren während der gesamten Säugezeit mit MRSA kolonisiert, die restlichen hatten einen wechselnden Kolonisierungsstatus.

Bei den Saugferkeln der ursprünglich MRSA-negativen Sauen waren wenige Tage nach der Geburt bereits 23 von 37 Saugferkeln mit MRSA kolonisiert (Tab. 1C). Fünfzehn Saugferkel waren während der gesamten Säugezeit mit MRSA kolonisiert.

Am Tag des Absetzens waren aus der Gruppe der MRSA-positiven Sauen noch neun Ferkel MRSA-positiv (Tab 1B). Bereits eine Woche nach dem Absetzen waren jedoch wieder 27 Ferkel mit MRSA kolonisiert (Tab. 1D). In der Negativgruppe waren zum Zeitpunkt des Absetzens 22 von 35 Ferkeln MRSA-positiv (Tab. 1C). Eine

Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb

X. Sidler et al.

Tabelle 1: Kolonisierungsstatuts mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) von Muttersauen vor und während der Säugezeit (A), der Saugferkel MRSA-positiver Muttersauen (B), der Saugferkel MRSA-negativer Muttersauen (C), der Absetzferkel MRSA positiver Muttersauen (D), und der Absetzferkel MRSA negativer Muttersauen (E).

A	23.05.	22.06.	04.07.	07.07.	11.07.	14.07.	18.07.	21.07.	25.07.	28.07.
Anzahl (n) Muttersauen MRSA +	3 (2/1/1/2)*	3 (2/1/1/2)	4 (2/0/1/4)	6 (4/0/2/6)	6 (5/3/3/5)	5 (4/2/3/5)	6 (4/3/4/5)	6 (6/1/5/5)	6 (3/2/2/6)	5 (3/2/1/4)
(n) Sauen MRSA -	3	3	2	0	0	1	0	0	0	1
B			04.07.	07.07.	11.07.	14.07.	18.07.	21.07.	25.07.	28.07.
(n) Saugferkel MRSA +			33 (20/1/12)*	29 (22/1/6)	26 (16/4/6)	22 (19/1/2)	19 (16/0/3)	24 (20/0/4)	22 (20/1/1)	9 (8/1/0)
(n) Saugferkel MRSA -			3	6	7	11	13	7	9	22
C			04.07.	07.07.	11.07.	14.07.	18.07.	21.07.	25.07.	28.07.
(n) Saugferkel MRSA +			23 (13/0/10)	33 (16/2/15)	31 (5/1/25)	23 (6/0/17)	25 (7/2/16)	29 (9/3/17)	25 (6/2/17)	22 (9/1/12)
(n) Saugferkel MRSA -			14	3	5	12	10	6	10	13
D		02.08.	04.08.	08.08.	11.08.	15.08.	18.08.			
(n) Absetzferkel MRSA +		27 (22/1/4) O	24 (18/0/6)	24 (18/2/4)	20 (17/0/3)	29 (19/4/6)	25 (21/1/3)			
(n) Absetzferkel MRSA -		4	7	7	11	2	6			
E		02.08.	04.08.	08.08.	11.08.	15.08.	18.08.			
(n) Absetzferkel MRSA +		33 (20/1/12)	34 (24/1/9)	32 (28/1/3)	28 (21/1/6)	33 (23/0/10)	33 (27/0/6)			
(n) Absetzferkel MRSA -		1	0	2	6	1	1			

*Anzahl positiver Muttersauen an den Lokalisationen (Nase/Rektum/Vagina/Zitzenhaut)

OAnzahl positiver Saug- und Absetzferkeln an den Lokalisationen (Nase/Rektum/Nase und Rektum)

Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb
X. Sidler et al.

Woche nach dem Absetzen waren praktisch alle Ferkel mit MRSA kolonisiert und blieben bis zum Verkauf in die Mast positiv (Tab. 1E).

Über die gesamte Beobachtungszeit des ersten Umtriebes waren insgesamt neun Ferkel der beiden Versuchsgruppen dauerhaft mit MRSA kolonisiert. Alle anderen Ferkel änderten den Kolonisierungsstatus mehrfach. Kein einziges Ferkel war während der gesamten Versuchsdauer negativ. Aufgrund der fehlenden Dekolonisierung wurde entschieden, den Versuch in der 6./7. Lebenswoche abubrechen und nicht erst wie ursprünglich vorgesehen beim Verkauf in die Mast in der 9./10. Woche. Für den zweiten und dritten Umtrieb wurde ein höher konzentrierter und anders gepufferter Bakteriophagen-Cocktail verwendet und der Cocktail nicht mehr übers Futter sondern mittels Dosatron® dem Tränkwasser (Umtrieb 2: 0.3%; Umtrieb 3: 3%) zugemischt, sowie der Raum in beiden Umtrieben dreimal täglich mittels Bakteriophagen-Cocktail vernebelt.

Für den zweiten Umtrieb wurde eine Woche vor dem Absetzen der MRSA-Status von 56 Ferkeln von fünf positiven Muttersauen überprüft. Zu diesem Zeitpunkt waren 25 Ferkel mit MRSA kolonisiert (Tab. 2) und am Absetztag waren 11 von 44 Ferkeln mit MRSA kolonisiert, während am Ende des Versuchs bis auf ein Ferkel alle einen MRSA-positiven Status aufwiesen (Tab. 2).

Beim dritten Durchgang war am Absetztag nur eines von 40 Ferkeln in der Nase mit MRSA kolonisiert (Tab. 2). Dies war auch eine Woche später noch der Fall. Vier Wochen später, kurz vor dem Verkauf an den Mäster, waren alle Tiere MRSA negativ.

Sowohl in den drei Buchten mit MRSA-positiven als auch in den Buchten mit den MRSA-negativen Muttersauen konnten am Tage der Geburt aus den Umgebungstupfern, welche von der Kotplatte, der Buchtenwand,

dem Futtertrog und dem Ferkelnest entnommen wurden, MRSA isoliert werden, obwohl alle Buchten beim Einstellen der Muttersauen eine Woche vor der Geburt MRSA-negativ getestet wurden. Die Verlaufsergebnisse der Umgebungspuren aus dem ersten Durchgang sind in Tabelle 3 dargestellt. Beim zweiten Durchgang konnten zum Zeitpunkt des Absetzens keine MRSA aus den 12 Umgebungstupfern (Kotplatte (2), Boden, Liegenest (2), Wände, Decken, Lüftung, Futtertrog (2), Tränkestellen (2)) isoliert werden. Eine Woche später waren jedoch alle 12 entnommenen Proben MRSA-positiv und blieben positiv bis zum Verkauf der Ferkel. Im dritten Durchgang wurde nur beim zweiten Probeentnahmezeitpunkt eine Tränke positiv auf MRSA getestet. Alle anderen 11 Umgebungstupfer blieben bis zum Ausstallen der Absetzferkel negativ. Interessanterweise konnte mittels PCR in allen am Versuchsende entnommenen Umgebungstupfern (Ferkelnest-Deckel, Buchtenwand, Deckeninstallationen, Fenster und Kotplatte) EB1 nachgewiesen werden, während der Nachweis von STA1 in allen Proben negativ war.

Diskussion

Die direkte Übertragung von LA-MRSA ST398 von Schwein zu Schwein ist sehr leicht möglich und ist somit das Hauptrisiko für eine Verbreitung von MRSA innerhalb der Schweinepopulation.⁵ Diese Übertragungskette kann nur wirkungsvoll unterbunden werden, wenn es gelingt, die Schweine vor dem Verkauf in die Mast auf dem Ferkelerzeugungsbetrieb zu dekolonisieren. Der eingesetzte Bakteriophagencocktail zeigte *in vitro* eine sehr gute Wirkung gegen MRSA Isolate aus dem Versuchsbetrieb. Trotz verschiedener Applikationsarten des Bakteriophagencocktails in den einzelnen Durchgängen konnte im Feldversuch ausser im Umtrieb 3, wo dem Trinkwasser 3% des Bakteriophagencocktails zugemischt und der Raum dreimal täglich mit dem Bakterio-

Tabelle 2: Kolonisierungsstatus und Lokalisationsstelle mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) der Absetzferkel der Umtriebe 2 und 3.

Umtrieb 2	11.01. 5 Tage vor Absetzen	16.01. Absetztag	23.01.	30.01.	06.02.	13.02.
(n) Ferkel MRSA +	25 (20/0/5) ^o	11 (8/2/1)	44 (19/0/25)	35 (32/0/3)	32 (26/0/6)	43 (29/0/14)
(n) Ferkel MRSA –	31	33	0	9	12	1
Umtrieb 3	17.05. 5 Tage vor Ab- setzen	23.05. Absetztag	30.5.	26.06.		
(n) Ferkel MRSA +	1 (1/0/0) ^o	1 (1/0/0)	1 (0/1/0)	2017		
(n) Ferkel MRSA –	39	39	39	40		

^o Anzahl positiver Saug- und Absetzferkeln an den Lokalisationen (Nase oder Rektum/Nase und Rektum)

Tabelle 3: Qualitativer mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Nachweis von Umgebungstupfern aus Abferkelbuchten MRSA-positiver und MRSA-negativer Muttersauen des ersten Umtriebes.

	Abferkelbucht mit MRSA-positiven Muttersauen				Abferkelbucht mit MRSA-negativen Muttersauen			
	Kotplatte	Buchtenwand	Futtertrog	Ferkelnest	Kotplatte	Buchtenwand	Futtertrog	Ferkelnest
25.06.2016	-	-	-	-	-	-	-	-
04.07.2016	+	+	--	+	--	+	-	-
07.07.2016	-	-	+	+	+	+	+	+
11.07.2016	+	-	+	-	-	-	+	-
14.07.2016	+	-	+	+	+	+	+	+
18.07.2016	+	+	+	-	+	-	+	+
21.07.2016	+	+	+	-	+	+	+	+
25.07.2016	+	+	+	+	-	-	-	+
28.07.2016	+	+	+	+	+	-	+	+
02.08.2016	+	+	+	+	+	+	+	+
04.08.2016	+	+	-	+	+	+	+	+
08.08.2016	+	+	-	+	+	+	+	-
11.08.2016	+	+	+	+	-	+	+	+
15.08.2016	+	+	+	+	+	-	+	+
18.08.2016	+	+	+	+	+	+	-	+

+ MRSA nachweisbar; - MRSA nicht nachweisbar

phagencocktail vernebelt wurde, keine MRSA-Eradikation in der Nase resp. im Darm erreicht werden. Der mangelnde Erfolg der Phagenintervention kann im ersten Umtrieb mit der mangelnden Stabilität des Bakteriophagencocktails erklärt werden. Capparelli et al. (2007) zeigten, dass bei Mäusen, welche mit *S. aureus* infiziert und mit 10^9 Bakteriophagen intravenös behandelt wurden, der Erreger vier Tage nach der Verabreichung bei 97% der Mäuse komplett aus der Blutbahn eliminiert werden konnte.¹³ Eine geringere Phagenkonzentration zeigte jedoch keine Wirkung. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Beobachtungen von anderen Forschergruppen überein, bei welchen Bakteriophagenkonzentrationen von minimal 10^8 Bakteriophagen/ml zu einem Therapieerfolg führten.^{14,49} Dass der Erfolg einer Bakteriophagentherapie primär von der Bakteriophagenkonzentration abhängig ist, wird von zahlreichen weiteren Autoren bestätigt.^{38,43,55,72} Nach Malik et al. (2017) sollte die Bakteriophagenkonzentration mindestens 100–1000-fach höher sein als die Bakterienzahl.³⁸

Der Therapieerfolg wird positiv beeinflusst, wenn zu Beginn einer Phagentherapie eine grosse Anzahl Bakterien, wie zum Beispiel bei einer akuten Infektion, vorliegt, da eine hohe Bakterienzahl die schnelle Vermehrung der Bakteriophagen begünstigt.³⁸ Werden die Phagen prophylaktisch oder bei Infektionen mit geringer Keimzahl eingesetzt, kann es zu einer Entfernung der Phagen durch das Wirtsimmunsystem kommen, vor allem durch Elimination der Phagen in der Milz.²⁹

Auch im 2. Umtrieb konnte trotz einer höheren Phagenkonzentration von 10^{10} Phagen/ml und veränderter Pufferung, welche zu einer erhöhten Stabilität des Bakteriophagencocktails führte, zu keinem Beprobungszeitpunkt eine Eradikation von MRSA erreicht werden. Ähnliche Resultate wie in der vorliegenden Studie wurden auch von Verstappen et al. (2016) berichtet, welche die Wirksamkeit einer Bakteriophagenkombination bestehend aus den Phagen K*170 und P68 in einer Konzentration von 10^9 PFU untersuchten.⁶³ Der Bakteriophagencocktail war in *in vitro* Versuchen wirksam, jedoch blieb die Wirkung eines Bakteriophagenhaltigen Gels bei experimentell mit MRSA kolonisierten Schweinen aus. Ebenso führte das Aufbringen von Bakteriophagen auf MRSA kolonisierte Schleimhaut-Explantaten zu keiner signifikanten Reduktion der MRSA.⁶³

Experimente zeigten, dass die Überlebensrate von Bakteriophagen eines gegen Staphylokokken gerichteten Phagencocktails bei 45 °C 100% beträgt, bei 65 °C aber auf 0% abfällt.⁶⁷ Aus diesem Grund wurde der Bakteriophagencocktail erst nach dem Hygienisierungsprozess, bei dem das Futter mit Dampf auf 80 °C erhitzt wird, auf das Futter gesprüht. In der gleichen Untersuchung wurde auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Überlebensrate der Phagen untersucht. In einem pH-Bereich zwischen 6 und 9.5 betrug die Überlebensrate 100%, während diese bei pH 5 (bei 37 °C während 3 h) nur noch ca. 60% und bei pH 4 nur noch 20% betrug.⁶⁷ In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass unter den getesteten Versuchsbedingungen UV-Licht keinen

Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb

X. Sidler et al.

Einfluss auf die Überlebensrate der Bakteriophagen hatte. Die Verkapselung von Bakteriophagen mit Liposomen zur Bekämpfung von Magen-Darminfektionen oder Lungeninfektionen führte in einer anderen Studie zu besseren Ergebnissen als der Einsatz eines ungekapselten Bakteriophagencocktails.⁵¹ Der Einfluss einer Verkapselung auf die Überlebensrate wurde in dieser Studie nicht untersucht. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der eingesetzte, 3-mal täglich versprühte Bakteriophagencocktail weder im neutralen pH-Bereich in der Nase noch in der Umgebung zu den Messzeitpunkten MRSA zu eliminieren vermochte.

In der Literatur wird mangelnder Erfolg einer Bakteriophagentherapie sehr kontrovers auch mit der Induktion von Antikörper gegen die eingesetzten Bakteriophagen diskutiert. Intravenös applizierte Bakteriophagen induzierten laut Loc-Carillo Antikörper, welche die Wirkung der Bakteriophagentherapie negativ beeinflussten,³⁷ während Kucharewicz-Krukowska³³ aufzeigte, dass Antikörper gegen die Staphylokokken-spezifischen Bakteriophagen keinen negativen Einfluss auf den Therapieerfolg hatten.

Der negative MRSA-Nachweis am Ende des dritten Umgangs in unserer Studie muss kritisch betrachtet werden, da in dieser Versuchsgruppe nur eines von 40 Ferkeln mit MRSA kolonisiert war. Bemerkenswert ist, dass zwischen dem ersten und zweiten sowie zwischen dem zweiten und dritten Umtrieb, in 2 Umtrieben kein einziges von 80 Ferkeln, welche eine Woche vor dem Absetzen getestet wurden, MRSA positiv war und daher der Versuch bis zum Auftreten von positiven Ferkeln im dritten Umtrieb unterbrochen werden musste. Die Stallungen wurden zwar vor jeder Neuebelegung gründlich gereinigt, aber ausser im Abferkelstall beim ersten Umtrieb, nie desinfiziert, was das Überleben der Bakteriophagen günstig beeinflusst haben könnte, zumal die

Umweltbedingungen im Schweinestall das Überleben der Bakteriophagen nicht beeinträchtigen sollten.⁶⁷ Es ist nicht auszuschliessen, dass durch das Besprühen der Muttersauen vor dem Einstellen in den Abferkelstall, das 2-mal wöchentliche Besprühen der Saugferkel und das 3-mal tägliche Vernebeln des Versuchsstalles sich die Bakteriophagen im Versuchsbetrieb angereichert haben und diese schlussendlich über verschiedene Vektoren in den ganzen Betrieb verschleppt wurden und so zeitverzögert, aber stetig zu einer Senkung des Infektionsdruckes beigetragen haben. In den Umgebungstüpfen, welche am Ende des Versuchs entnommen wurden, konnten mittels PCR nur der im Phagencocktail eingesetzte EB1 nicht aber der verwendete STA1 nachgewiesen werden. Dies könnte mir einer höheren Tenazität von EB1 im Vergleich zu STA1 zu tun haben. Da mittels einer PCR nur DNA nachgewiesen wird, ist ungewiss, ob die Phagen noch infektiös waren.

Fazit

Im Beobachtungszeitraum konnte durch die Anwendung eines Phagencocktails keine Eradikation von LA-MRSA in Nase und Kot der Ferkel erreicht werden. Hauptgründe sind wahrscheinlich in der zu geringen Konzentration der Bakteriophagen am Wirkungsort und der mangelnden Stabilität des Bakteriophagencocktails zu suchen.

Dank

An dieser Stelle möchten wir uns bei allen bedanken, die dieses Projekt ermöglicht haben. Ganz besonderer Dank gilt dem Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV) sowie dem Bundesamt für Landwirtschaft (BLW) für die Finanzierung der Studie.

Essai de terrain en vue de l'éradication de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (MRSA) par des bactériophages dans un élevage porcin

Au cours des dernières années, des *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline associé au bétail (LA-MRSA) ont été fréquemment trouvés chez les porcs. La colonisation du personnel soignant par des LA-MRSA est fortement corrélée à l'intensité et à la durée du contact avec les animaux et à la prévalence de LA-MRSA dans le troupeau. En médecine humaine, les infections à staphylocoques ont été contrôlées avec suc-

Studio sul terreno in un allevamento di suini per eradicare lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) utilizzando dei batteriofagi.

Negli ultimi anni tra gli animali da reddito, lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (LA-MRSA) era maggiormente presente nei suini. La colonizzazione del personale di custodia con LA-MRSA era strettamente correlata all'intensità e alla durata del contatto con gli animali e alla prevalenza della mandria con LA-MRSA. Nella medicina umana, le infezioni da stafilococco sono combattute con successo via la somministrazione topica o sistemica di batteriofagi specifici allo stafilococco.

cès par l'administration topique ou systémique de bactériophages associés à *Staphylococcus*. C'est pourquoi la présente étude a étudié l'effet d'un cocktail de bactériophages sur la colonisation de la peau et des muqueuses des porcs atteints de SARM dans une exploitation porcine à forte prévalence de SARM. Dans une première expérience, les truies ont été lavées avec un cocktail de bactériophages et le nez, la bouche et le vagin ont été rincés avant leur admission dans le local de mise bas. Ensuite, 10 ml du cocktail de bactériophages ont été administrés quotidiennement aux truies sur l'aliment jusqu'au sevrage. Les porcelets allaitants ont été pulvérisés et échantillonnés deux fois par semaine pendant la période d'allaitement et traités avec le cocktail de bactériophages sur l'aliment pendant la période de sevrage. Dans d'autres expériences, le local de sevrage a été nébulisée trois fois par jour avec un cocktail de bactériophages et différentes concentrations de bactériophages ont été ajoutées à l'eau de boisson via Dosatron®. Cependant, aucune des expériences n'a montré d'éradication du SARM ni dans le nez ni dans les fèces.

Mots-clés: bactériophages, prévalence de la colonisation, éradication, SARM ST398, porc

Per questo motivo nel presente studio si è voluto studiare l'effetto della somministrazione di un cocktail di batteriofagi sulla colonizzazione della pelle e delle mucose dei suini affetti da MSRA in un allevamento con un'alta prevalenza di MSRA. In un primo esperimento, alle scrofe è stato lavato la bocca, il naso e la vagina con un cocktail di batteriofagi per stafilococchi prima di entrare nel box per il parto. Dopodiché, le scrofe hanno ricevuto 10 ml di un cocktail di batteriofagi ogni giorno fino allo svezzamento tramite il mangime. I suinetti durante il periodo dell'allattamento sono stati spruzzati e testati ogni settimana per due volte con un cocktail di batteriofagi sul mangime. In altri esperimenti, un cocktail di batteriofagi è stato nebulizzato nella zona dello svezzamento tre volte al giorno e diverse concentrazioni di batteriofagi sono state addizionate all'acqua potabile via Dosatron®. In nessun esperimento è stato possibile rilevare un'eradicazione del MRSA nel naso o nelle feci.

Parole chiave: batteriofagi, eradicazione, prevalenza di colonizzazione, MRSA ST398, suini

Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb

X. Sidler et al.

Literaturliste

- ¹ ARCHVET- Gesamtbericht 2014
<https://www.blv.admin.ch.../arch-vet-gesamtbericht-2014>
- ³ Abedon ST, Thomas-Abedon C, Thomas A, Mazure H. Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage* 2011; 1: 174-178.
- ³ 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. *EFSA Journal* 2009; 7(11): 1376.
- ⁴ Alt K, Fetsch A, Schroeter A, Guerra B, Hammerl JA, Hertwig S, et al.: Factors associated with the occurrence of MRSA CC398 in herds of fattening pigs in Germany. *BMC Vet Res* 2011;7: 69.
- ⁵ Bangerter PD, Sidler X, Perreten V, Overesch G: Longitudinal study on the colonisation and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farms. *Vet Microbiol* 2016; 183: 125-134.
- ⁶ Bigwood T, Hudson JA, Billington C, Carey-Smith GV, Heinemann JA. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol* 2008; 25: 400-406.
- ⁷ Broens EM, Espinosa-Gongora C, Graat EA, Vendrig N, Van Der Wolf PJ, Guardabassi L, et al.: Longitudinal study on transmission of MRSA CC398 within pig herds. *BMC Vet Res* 2012; 8: 58.
- ⁸ Broens EM, Graat EA, Van der Wolf PJ, Van de Giessen AW, De Jong MC: Prevalence and risk factor analysis of livestock associated MRSA-positive pig herds in The Netherlands. *Prev Vet Med* 2011; 102: 41-49.
- ⁹ Broens EM, Graat EA, Van der Wolf PJ, Van de Giessen AW, De Jong MC: Transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among pigs during transportation from farm to abattoir. *Vet J* 2011; 189: 302-305.
- ¹⁰ Broens EM, Graat EA, van der Wolf PJ, van de Giessen AW, van Duijkeren E, Wagenaar JA, et al.: MRSA CC398 in the pig production chain. *Prev Vet Med* 2011; 98: 182-189.
- ¹¹ Burrows B, Harper DR, Anderson J, McConville M, Enright MC. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 775-785.
- ¹² Callaway TR, Edrington TS, Brabban A, Kutter B, Karriker L, Stahl C, Wagstrom E, Anderson R, Poole TL, Genovese K, Krueger N, Harvey R, Nisbet DJ. Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce *Salmonella* populations in growing swine. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8: 261-266.
- ¹³ Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2765-2773.
- ¹⁴ Chhibber S, Kaur T, Sandeep Kaur. Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56022. doi: 10.1371/journal.pone.0056022
- ¹⁵ Chhibber S, Gupta P, Kaur S. Bacteriophage as effective decolonising agent for elimination of MRSA from anterior nares of BLAB/c mice. *BMC Microbiol* 2014; 14: 212. doi: 10.1186/s12866-014-0212-8.
- ¹⁶ Carlton RM: Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp* 1999; 47: 267-274.

- Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb
- X. Sidler et al.
- 17 Crombe F, Argudin MA, Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P: Transmission dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Front Microbiol* 2013; 4: 57.
- 18 Cuny C, Wieler LH, Witte W: Livestock-Associated MRSA: The impact on Humans. *Antibiotics* 2015; 4: 521-543.
- 19 de Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheuevel MG, Dam-Deisz WD, Boshuizen HC, et al.: High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 2007; 122: 366-372.
- 20 D'Hérelle F: Sur une microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad Sci Ser D*, 1917; 165: 373-375.
- 21 Guenther S, Huwyler D, Richard S, Loessner MJ: Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 93-100.
- 22 Friese A, Schulz J, Hoehle L, Fetsch A, Tenhagen BA, Hartung J, et al.: Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns. *Vet Microbiol* 2012; 158: 129-135.
- 23 Graveland H, Duim B, van Duijkeren E, Heederik D, Wagenaar JA: Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *Int J Med Microbiol* 2011; 301: 630-634.
- 24 Guardabassi L, O'Donoghue M, Moodley A, Ho J, Boost M: Novel lineage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1998-2000.
- 25 Hendrix RW, Smith MC, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF: Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 2192-2197.
- 26 Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C: Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. *Euro Surveill* 2010; 15(16).
- 27 Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM: Alternatives to antibiotics: utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent foodborne pathogens. *Poult Sci* 2005; 84: 655-659.
- 28 Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuevel MG, Heck ME, Pluister GN, et al.: Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2000; 5: 26.
- 29 Inal JM: Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Ther Exp* 2003; 51: 237-244.
- 30 Kaźmierczak Z, Górski A, Dąbrowska K: Facing antibiotic resistance: *Staphylococcus aureus* phages as a medical tool. *Viruses* 2014 Jul 1;6(7):2551-70. doi: 10.3390/v6072551. Review. Erratum in: *Viruses* 2015; 7(4):1667.
- 31 Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol* 2008; 128(3-4): 298-303.
- 32 Kim K, Ingale S, Kim J, Lee S: Bacteriophages and probiotics both enhance the performance of growing pigs. *Anim Feed Sci Technol* 2014; 196: 88-95.
- 33 Kucharewicz-Krukowska A, Slopek S: Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch Immunol Ther Exp* 1987; 35: 553-561.
- 34 Le Loir Y, Baron F, Gautier M: *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2003; 2: 63-76.
- 35 Leung CYJ, Weitz JS: Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system. *J Theor Biol* 2017; 429: 241-252.
- 36 Lewis HC, Molbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, Sorum M, et al.: Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1383-1389.
- 37 Loc-Carrillo C, Abedon ST: Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 2011; 1: 111-114.
- 38 Malik DJ, Sokolov IJ, Vinner GK, Mancuso F, Cinquerrui S, Vladisavljevic GT, et al.: Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv Colloid Interface Sci* 2017; 249: 100-133.
- 39 Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda M, Ujihara T, Shuin T, et al.: Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis* 2003; 187: 613-624.
- 40 Meemken D, Blaha T, Tegeler R, Tenhagen BA, Guerra B, Hammerl JA, et al.: Livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LaMRSA) isolated from lesions of pigs at necropsy in northwest Germany between 2004 and 2007. *Zoonoses Public Health* 2010; 57: 143-148.
- 41 Meladze GD, Mebuke MG, Chkhetia NSH, Kiknadze NIa, Koguashvili GG: Efficacy of staphylococcal bacteriophage in the treatment of purulent lung and pleural diseases. *Grudn Khir* 1982; 1: 53-56.
- 42 Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłak M, Wojtasik E, Górski A: Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res* 2012; 83: 73-121.
- 43 Payne RJ, Jansen VA: Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. *J Theor Biol* 2001; 208: 37-48.
- 44 Perez Pulido R, Grande Burgos MJ, Galvez A, Lucas Lopez R: Application of bacteriophages in post-harvest control of human pathogenic and food spoiling bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 2016; 36: 851-861.
- 45 Plata K, Rosato AE, Wegrzyn G: *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol* 2009; 56: 597-612.
- 46 Pletinckx LJ, Dewulf J, De Bleecker Y, Rasschaert G, Goddeeris BM, De Man I: Effect of a disinfection strategy on the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 prevalence of sows, their piglets and the barn environment. *J Appl Microbiol* 2013; 114: 1634-1641.
- 47 Reyes A, Semenkovich NP, Whiteson K, Rohwer F, Gordon JI: Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 607-617.
- 48 Sakandelidze V, and Meipariani A: Use of combined phages in suppurative-inflammatory diseases. *Microbiol Epidemiol Immunobiol* 1974; 6: 135-136.
- 49 Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Stemmer F, El-Jade M, Reif M, Hack S, Meilaender A, Montabauer G, Fimmers R, Parcina M, Hoerauf A, Exner M, Petersen B, Bierbaum G, Bekerredjian-Ding I: Analysis of transmission of MRSA and ESBL-Enterobacteriaceae among pigs and farm personnel. *PLoS One*. 2015 Sep 30;10(9):e0138173. doi: 10.1371/journal.pone.0138173. eCollection 2015.
- 50 Schulz J, Friese A, Klees S, Tenhagen BA, Fetsch A, Rosler U, et al.: Longitudinal study of the contamination of air and of soil surfaces in the vicinity of pig barns by livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 5666-5671.

- ⁵¹ Singla S, Harjai K, Katare OP, Chhibber S. Bacteriophage-loaded nanostructured lipid carrier: improved pharmacokinetics mediates effective resolution of *Klebsiella pneumoniae*-induced lobar pneumonia. *J Infect Dis* 2015; 212: 325-334.
- ⁵² Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS One* 2009; 4: e4258.
- ⁵³ Smith HW, Huggins MB, Shaw KM. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J Gen Microbiol* 1987; 133:1111-1126.
- ⁵⁴ Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 649-659.
- ⁵⁵ Tanji Y, Shimada T, Fukudomi H, Miyayama K, Nakai Y, Unno H. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *J Biosci Bioeng* 2005; 100: 280-287.
- ⁵⁶ Tenhagen BA, Fetsch A, Stuhrenberg B, Schleuter G, Guerra B, Hammerl JA, et al.: Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. *Vet Rec* 2009; 165: 589-593.
- ⁵⁷ Van Cleef BA, Broens EM, Voss A, Huijsdens XW, Zuchner L, Van Benthem BH, et al.: High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 2010; 138: 756-763.
- ⁵⁸ van Cleef BA, Verkade EJ, Wulf MW, Buiting AG, Voss A, Huijsdens XW, et al.: Prevalence of livestock-associated MRSA in communities with high pig-densities in The Netherlands. *PLoS One* 2010; 5: e9385.
- ⁵⁹ van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, de Neeling AJ, et al.: Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Vet Microbiol* 2008; 126: 383-389.
- ⁶⁰ Vandenheuvel D, Lavigne R, Brussow H: Bacteriophage Therapy: Advances in formulation strategies and human clinical trials. *Annu Rev Virol* 2015; 2: 599-618.
- ⁶¹ Verheghe M, Crombe F, De Man I, Haesebrouck F, Butaye P, Heyndrickx M, et al.: Preliminary study of the effect of sow washing, as performed on the farm, on livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin status and strain diversity. *J Swine Health Prod* 2013; 21: 313-319.
- ⁶² Verheghe M, Pletinckx LJ, Crombe F, Van Weyenberg S, Haesebrouck F, Butaye P, et al.: Cohort study for the presence of livestock-associated MRSA in piglets: effect of sow status at farrowing and determination of the piglet colonization age. *Vet Microbiol* 2013; 162: 679-686.
- ⁶³ Verstappen KM, Tulinski P, Duim B, Fluit AC, Carney J, van Nes A, et al.: The effectiveness of bacteriophages against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 nasal colonization in pigs. *PLoS One* 2016; 11: e0160242.
- ⁶⁴ Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1965-1966.
- ⁶⁵ Wagenaar JA, Yue H, Pritchard J, Broekhuizen-Stins M, Huijsdens X, Mevius DJ, et al.: Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet Microbiol* 2009; 139: 405-409.
- ⁶⁶ Wall SK, Zhang J, Rostagno MH, Ebner PD. Phage therapy to reduce preprocessing Salmonella infections in market-weight swine. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76: 48-53.
- ⁶⁷ Wang Z, Zheng P, Ji W, Fu Q, Wang H, Yan Y, Sun J. SLPW: A virulent bacteriophage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Front Microbiol*. 2016; 7: 934. doi: 10.3389/fmicb.2016.00934. eCollection 2016.
- ⁶⁸ Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Górski A. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplant Proc*. 2003; 35:1385-1386.
- ⁶⁹ Weber-Dabrowska B, Jonczyk-Matysiak E, Zaczek M, Lobočka M, Lusiak-Szelachowska M, Gorski A: Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. *Front Microbiol* 2016; 7: 1177.
- ⁷⁰ Weese JS, Zwambag A, Rosendal T, Reid-Smith R, Friendship R: Longitudinal investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in piglets. *Zoonoses Public Health* 2011; 58(4): 238-243.
- ⁷¹ WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. World Health Organization http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf
- ⁷² Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Mar;49(3):1220-1221.
- ⁷³ Yan L, Hong SM, Kim IH. Effect of bacteriophage supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and fecal microbial shedding in growing pigs. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2012; 25:1 451-456.
- Feldversuch zur Eradikation von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Bakteriophagen in einem Schweinezuchtbetrieb
- X. Sidler et al.

Korrespondenzadresse

Xaver Sidler, Prof. Dr. med. vet.
 Departement Nutztiere
 Abteilung Schweinemedizin
 Vetsuisse Fakultät
 Universität Zürich
 E-Mail: xsidler@vetclinics.uzh.ch