

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.1.1 Gattungsmerkmale	4
2.1.2 Zellwandaufbau	4
2.2 Biochemische Differenzierung	5
2.2.1 Kulturmorphologie	5
2.2.1.1 „Small Colony Variants“	6
2.2.2 Katalase- und Koagulasetestung	8
2.3 Molekularbiologischer Nachweis von MRSA	9
2.3.1 Aufbau und Sequenzierung der <i>SCC<sub>mec</sub></i> -Kassette mit Nachweis des <i>mecA</i> -Gens	9
2.3.2 Multi-Locus Sequence Typing (MLST)	13
2.3.3 <i>Spa</i> -Typisierung (Staphylokokken-Protein A Typisierung)	14
2.3.4 MRSA-Identifikation: MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionisation –time of flight mass spectrometry)	15
2.3.5 MRSA-Identifikation: Microarray	16
2.3.6 MRSA-Identifikation: Pastorex-Staph-Plus	16
2.3.7 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	16
2.4 Virulenzfaktoren	17
2.4.1 Exotoxine	18
2.4.1.1 Panton-Valentine-Leukozidin (PVL-Gen), Leukozidin-D/E ( <i>lukD</i> -/ <i>lukE</i> -Gen) und Gamma-Hämolysin ( <i>hlg</i> -Gen)	18
2.4.1.2 Hämolysine	20
2.4.1.2.1 Alpha-Hämolysin	20
2.4.1.2.2 Beta-Hämolysin (Shingomyelase C)	20
2.4.1.2.3 Delta-Hämolysin	20
2.4.2 Die Staphylokinase ( <i>sak</i> -Gen), das Chemotaxis-inhibiting Protein ( <i>chp</i> -Gen) und der Staphylococcal Complement Inhibitor ( <i>scn</i> -Gen)	21
2.4.3 Accessory-Gen-Regulator ( <i>agr</i> -Gen)	21
2.4.4 Pyrogenic toxins superantigens (PTSAg)	22

2.4.4.1 Die Enterotoxine und das Toxische Schock Syndrom Toxin-1 ( <i>tsst1</i> -Gen)	22
2.4.4.2 Staphylococcen Superantigen-like Proteine	23
2.4.5 MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)	23
2.4.5.1 Protein A	24
2.4.5.2 Clumping Faktor A und B ( <i>clfA</i> -/ <i>clfB</i> -Gen)	24
<b>2.5 MRSA bei Menschen und Tieren</b>	<b>28</b>
2.5.1 Hospital-acquired Methicillin-resistente <i>S. aureus</i> (HA-MRSA)	28
2.5.2 Community-associated MRSA (CA-MRSA)	29
2.5.3 Livestock associated MRSA (LA-MRSA)	31
2.5.3.1 Vorkommen und Evolution von LA-MRSA bei Schweinen, Personen mit Schweinekontakt	31
2.5.3.2 Rinder	38
2.5.3.3 Pferde	39
2.5.3.4 Esel	40
2.5.3.5 Geflügel	40
2.5.3.6 Kleintiere	41
2.5.3.7 Zootiere	42
<b>2.6 Resistenzen</b>	<b>42</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Projektaufbau</b>	<b>47</b>
3.1.1 Schweinebetriebe	47
3.1.1.1 Nasentupfer von Schweinen und Umgebungsproben	47
3.1.1.2 Nasentupfer von Landwirten, Tierärzten und Studenten der Veterinärmedizin	48
3.1.1.2.1 Personenbezogene Datenerhebung mit Hilfe eines Fragebogens	48
3.1.1.3 Beprobte Schweinebetriebe mit Betriebsdaten	48
<b>3.2 Schweineassoziierte Proben aus dem europäischen Ausland</b>	<b>57</b>
<b>3.3 Krankenhauspatienten</b>	<b>59</b>
<b>3.4 Probenentnahme und Transport</b>	<b>60</b>
3.4.1 Nasentupfer der Schweine	60
3.4.2 Staubproben	60
3.4.3 Sockentupfer	61
3.4.4 Tränken	61

3.4.5 Spielzeuge	61
3.4.6 Landwirte, Tierärzte und Studenten	62
3.4.7 Probentransport	62
3.4.8 Krankenhauspatienten	62
<b>3.5 Bakteriologische Untersuchung</b>	<b>63</b>
3.5.1 Anzucht und Isolierung von MRSA	63
3.5.1.1 Nasentupfer der Schweine, Landwirte, Tierärzte, Studenten und die übersandten MRSA-Tupfer aus dem Ausland	63
3.5.1.2 Anzucht der Tränketupfer und Tupfer der beprobten Spielzeuge	64
3.5.1.3 Anzucht der Sockentupfer	64
3.5.1.4 Anzucht der Staubproben	65
3.5.1.5 Anzucht der MRSA von Krankenhauspatienten	65
3.5.1.6 Anzucht auf MRSA-ID und COS-Agar mit Auswertung	66
3.5.1.7 Hämolyseverhalten	67
<b>3.6 Biochemische Differenzierung</b>	<b>68</b>
3.6.1 Katalasetest	68
3.6.2 Pastorex Staph-Plus Test	68
<b>3.7 Konservierung der MRSA</b>	<b>71</b>
<b>3.8 Molekularbiologische Differenzierung</b>	<b>72</b>
3.8.1 MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionisation –time of flight mass spectrometry)	72
3.8.1.1 Beladung des Metalltargets	72
3.8.1.2 MALDI-TOF Programmierung	73
3.8.1.3 MALDI-TOF Analyse	74
3.8.2 VITEK2	75
3.8.2.1 Beschreibung des VITEK2	75
3.8.2.2 Aufarbeitung der MRSA-Isolate	76
3.8.2.3 Interpretation und Auswertung der Ergebnisse des VITEK2	77
3.8.3 PCR (Polymerasekettenreaktion)	78
3.8.3.1 Beschreibung der PCR-Methode zum Nachweis des <i>mecA</i> -, <i>femB</i> - und <i>nuc</i> -Gens der MRSA der Krankenhauspatienten	78
3.8.3.2 Nukleinsäureisolation aus den <i>S. aureus</i> Isolaten	79
3.8.3.3 Herstellung des Mastermixes	79

3.8.3.4 Extraktions- und Amplifikationskontrolle	80
3.8.3.5 Durchführung der PCR	81
3.8.3.6 Bewertung der Ergebnisse	81
3.8.4 Microarray	82
3.8.4.1 DNA Extraktion	83
3.8.4.2 Lineare Amplifikation mit Biotin-Markierung	85
3.8.4.3 Genotypisierung	85
3.8.4.3.1 Hybridisation	85
3.8.4.3.2 Erster Wasch-Schritt	86
3.8.4.3.3 Straptavidin-Horseradish-Peroxidase Verdünnung	86
3.8.4.3.4 Zweiter Wasch-Schritt	86
3.8.4.3.5 Farbreaktion	86
3.8.4.3.6 Analyse	87
3.9 Statistische Auswertung	88
4. Ergebnisse	89
<i>Teil I: MRSA-Prävalenz in Schweinebetrieben</i>	89
4.1 MRSA-Prävalenz in Schweinebetrieben	89
4.1.1 Anzahl positiver Betriebe: Herdenprävalenz	92
4.1.2 Intraherdenprävalenz der Schweine mit MRSA	95
4.1.3 MRSA-Prävalenz bei Ferkeln, Absetzern, Sauen und Mastschweinen unterschiedlicher Altersklassen	97
4.2 MRSA-Prävalenz bei Landwirten, Tierärzten und Studenten	99
4.3 MRSA-Prävalenz von Umgebungsproben	102
4.4 MRSA-Vorkommen nach geographischer Verteilung	105
4.5 MRSA in unterschiedlichen Betriebsstrukturen	107
4.6 Angaben der Landwirte über Antibiotikagaben in ihrem Betrieb	109
<i>Teil II. Ergebnisse der MRSA-Anzucht</i>	112
4.7 Ergebnisse der MRSA-Anzucht der schweineassoziierten Proben: Anzucht, Katalase-, Pastorex-Staph-Plus Test, MALDI-TOF und Vitek2	112
4.8 MRSA der Krankenhauspatienten: Die Ergebnisse der PCR der Krankenhauspatienten	113
<i>Teil III. Vergleich humaner und porciner MRSA unter besonderer Berücksichtigung der Virulenzfaktoren</i>	114

<b>4.9 Genotypisierung mittels Microarray</b>	<b>114</b>
4.9.1 Genotyp der MRSA verschiedener Schweinealtersklassen	120
4.9.2 Genotyp der MRSA von Landwirten, Tierärzten und Studenten	120
4.9.3 Genotyp der MRSA aus Umgebungsproben	121
4.9.4 Genotyp der MRSA von Krankenhauspatienten	122
<b>4.10 Das Vorkommen von Virulenzfaktoren und wichtigen Genen zur Genotypisierung</b>	<b>126</b>
4.10.1 Das <i>mecA</i> - und <i>nuc</i> -Gen	126
4.10.2 Das Pantone-Valentine-Leukozidin (PVL-Gen)	126
4.10.3 Das Gamma-Hämolysin ( <i>hly</i> -Gen)	127
4.10.4 Das Gamma-Hämolysin, Alpha-Hämolysin, Beta-Hämolysin (Shingomyelase C) und Delta-Hämolysin ( <i>hly</i> , <i>bla</i> , <i>hly</i> und <i>hly</i> -Gen)	128
4.10.5 Die Cassette Chromosom Recombinase Gene ( <i>ccr</i> -Gene)	129
4.10.6 Die Accessory-Gen-Regulator-Gene ( <i>agr</i> -Gen)	135
4.10.7 Das Collagen-binding Adhesin ( <i>cna</i> -Gen)	139
4.10.8 Potassium-translocating ATPase A und B ( <i>kdpA</i> , <i>kdpB</i> -Gen)	140
4.10.9 Leukocidin D und E ( <i>lukD</i> - und <i>lukE</i> -Gen)	141
4.10.10 Die Staphylokinase ( <i>sak</i> -Gen), das Chemotaxis-inhibiting Protein ( <i>chp</i> -Gen) und der Staphylococcal Complement Inhibitor ( <i>scn</i> -Gen)	143
4.10.11 Protein A ( <i>spa</i> -Gen)	144
4.10.12 Das Fibrinogenbindungs-Protein ( <i>fib</i> -Gen mit 19kDa)	144
4.10.13 Fibronectinbindendes Protein ( <i>fnb</i> -Gen)	145
4.10.14 Das <i>Staphylococcus aureus</i> Oberflächenprotein G ( <i>sag</i> -Gen)	147
4.10.15 Clumping-Faktor und Kapsel ( <i>clf</i> - und <i>cna</i> -Gen)	148
4.10.16 Die Enterotoxine ( <i>sea-sej</i> -Gene)	148
4.10.17 Das Toxin Schock Syndrom Toxin-1 ( <i>stx1</i> -Gen)	150
4.10.18 Die Staphylococcal Superantigen-like Proteine 1-11 ( <i>ssl-1-11</i> -Gen)	150
4.10.19 MRSA des CC398 der Krankenhauspatienten	151
<b>4.11 Die genotypisierten MSSA-Isolate</b>	<b>153</b>
<b>4.12 Die MRSA-Isolate aus Europa</b>	<b>154</b>
<b>4.13 Ergebnisse des Fragebogens</b>	<b>158</b>
<b>5. Diskussion</b>	<b>160</b>
<b>5.1 MRSA-Prävalenz in Schweinebetrieben</b>	<b>160</b>

5.1.1 MRSA-Herdenprävalenz mit MRSA-Vorkommen nach geographischer Verteilung und MRSA-Prävalenz der Schweine	160
5.1.2 Intraherdenprävalenz der Schweine mit MRSA	164
5.1.3 MRSA-Prävalenz bei unterschiedlichen Altersklassen: Ferkel, Absetzer, Mastschweine, Sauen und Deckeber	165
5.2 MRSA-Prävalenz bei Landwirten, Tierärzten und Studenten	166
5.3 MRSA Prävalenz von Umgebungsproben	168
5.4 MRSA in unterschiedlichen Betriebsstrukturen	169
5.5 Ergebnisse der MRSA-Anzucht	170
5.6 Genotypen der Isolate von Schweinen, Umgebungsproben, schweineassoziierten Menschen und der Krankenhauspatienten	172
5.7 Virulenzfaktoren und wichtigen Gene zur Genotypisierung	176
5.7.1 Das Pantone-Valentine Leukozidin (PVL-Gen)	176
5.7.2 Das Gamma-Hämolysin, Alpha-Hämolysin, Beta-Hämolysin (Shingomyelase C) und Delta-Hämolysin ( <i>hlg</i> , <i>bla</i> , <i>hly</i> - und <i>hld</i> -Gen)	178
5.7.3 Die <i>SCCmec</i> und die „Cassetten Chromosom Recombinase Gene“ ( <i>crr</i> -Gene)	179
5.7.4 Die Accessory-Gen-Regulator-Gene ( <i>agr</i> -Gen)	181
5.7.5 Potassium-translocating ATPase A und B ( <i>kdpA</i> , <i>kdpB</i> -Gen)	182
5.7.6 Leukocidin D und E ( <i>lukD</i> , <i>lukE</i> -Gen)	182
5.7.7 Staphylokinase ( <i>sak</i> -Gen), Chemotaxis-inhibiting Protein ( <i>chp</i> -Gen) und Staphylococcal Complement Inhibitor ( <i>scn</i> -Gen)	183
5.7.8 Collagen-binding Adhesin ( <i>cna</i> -Gen)	183
5.7.9 Fibrinogenbindungs-Protein ( <i>fib</i> -Gen, <i>fib</i> -19kDa)	185
5.7.10 Fibronectinbindendes Protein ( <i>fnaA</i> - und <i>fnaB</i> -Gen)	185
5.7.11 Das <i>Staphylococcus aureus</i> Oberflächenprotein G ( <i>sag</i> -Gen)	186
5.7.12 Clumping-Faktor ( <i>clfA</i> - und <i>clfB</i> -Gen) und Kapsel	186
5.7.13 Die Enterotoxine ( <i>sea-sej</i> -Gen) und das Toxin-Schock-Syndrom-Toxin ( <i>tsst1</i> -Gen)	187
5.7.14 Staphylococcal Superantigen-like Proteine 1-11 ( <i>ssl1-11</i> -Gen)	188
5.7.15 Vergleichende Darstellung der Virulenzfaktoren des ST398 aus Schweinebetrieben mit anderen MRSA sowie die Entwicklung der Aufnahme von neuen Virulenzfaktoren seit dem Jahr 2005	189
5.8 MRSA des CC398 der Krankenhauspatienten	194
5.9 MSSA	195

5.10 MRSA aus Europa	196
5.11 Auswertung der Fragebögen und Angaben der Landwirte zu Antibiotikagaben in ihrem Betrieb	197
6. Schlussfolgerung	199
7. Zusammenfassung	203
8. Summary	206
Literaturverzeichnis	209
Tabellenverzeichnis	293
Abbildungsverzeichnis	296
Anhang	299
Danksagung	302
Erklärung	303