

Inhalt

ABBILDUNGSGGSVEREICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 Charakteristik von <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.1.1 Virulenzassoziierte Faktoren von <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.2 Resistenzen von <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.2.1 Allgemeine Problematik der Antibiotikaresistenz.....	6
2.1.2.2 Resistenz gegen β -Lactam Antibiotika.....	6
2.1.2.3 Resistenzen gegen nicht- β -Lactam Antibiotika.....	8
2.2 Nachweismethoden von MRSA.....	11
2.2.1 Kultureller Nachweis.....	11
2.2.2 Molekularbiologische Untersuchungsverfahren zur epidemiologischen Differenzierung von MRSA.....	11
2.2.2.1 Nachweis des <i>mecA</i> -Gens.....	11
2.2.2.2 SCC <i>mec</i> -Sequenzierung.....	12
2.2.2.3 <i>spa</i> -Typisierung.....	12
2.2.2.4 Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	13
2.2.2.5 PCR zur Bestätigung der Zugehörigkeit zum klonalen Komplex CC398.....	14
2.2.2.6 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	14
2.2.2.7 DNA-Microarray-Technologie.....	15
2.2.2.8 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS).....	16
2.3 Epidemiologie von MRSA.....	17
2.3.1 Vorkommen und Bedeutung von MRSA bei Tieren.....	17
2.3.1.1 MRSA bei Schweinen.....	17

2.3.1.2	MRSA bei Geflügel.....	19
2.3.1.3	MRSA bei Wiederkäuer.....	21
2.3.1.4	MRSA bei Companion Animals.....	22
2.3.2	Vorkommen und Bedeutung von MRSA beim Menschen.....	23
2.3.2.1	„Hospital-assoziierte“ MRSA (ha-MRSA).....	23
2.3.2.2	„Community-assoziierte“ MRSA (ca-MRSA).....	23
2.3.2.3	„Livestock-assoziierte“ MRSA (la-MRSA).....	24
2.4	Bedeutung und Vorkommen von MRSA in Umgebungsproben.....	25
3	MATERIAL.....	27
3.1	Herkunft der Isolate.....	27
3.2	Geräte.....	27
3.3	Chemikalien.....	28
3.4	Fertige Reaktionssystem (Kits).....	30
3.5	Nährmedien.....	30
3.6	Lösungen.....	30
3.7	Primer zur PCR Amplifikation.....	33
3.8	<i>Staphylococcus aureus</i> Referenzstämme.....	34
3.8.1	Referenzstandard NCTC 8325.....	34
3.8.2	MRSA Kontrollstamm 08S00699.....	34
3.9	Verwendete Computerprogramme.....	34
4	METHODEN.....	35
4.1	Probenahme in den Tierbeständen – Longitudinalstudie.....	35
4.1.1	Probenahmeplan.....	35
4.1.2	Probenahme in den Beständen.....	35
4.1.3	Bearbeitung der Proben.....	36
4.1.4	Auswahl der Isolate.....	37
4.2	Molekularbiologische Untersuchungsverfahren.....	38
4.2.1	DNA-Extraktion - asservierte Isolate.....	38

4.2.2	<i>spa</i> -Typisierung.....	38
4.2.2.1	Durchführung der PCR.....	38
4.2.2.2	Gelelektrophorese und Dokumentation.....	39
4.2.2.3	DNA-Sequenzanalyse.....	39
4.2.3	PCR zur Bestätigung der Zugehörigkeit zum Clonal Complex (CC) 398.....	39
4.2.3.1	Durchführung der PCR.....	39
4.2.4	Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	40
4.2.4.1	Durchführung der PCR.....	41
4.2.5	Makrorestriktionsanalyse mit anschließender Pulsfeldgelelektrophorese für MRSA ST398.....	42
4.2.6	Microarray-Analyse.....	44
4.2.7	Differenzierung der Isolate durch MALDI-TOF-MS.....	45
5	ERGEBNISSE.....	51
5.1	<i>spa</i> -Typisierung.....	51
5.1.1	Geflügelmastbestände.....	52
5.1.2	Schweinebestände.....	54
5.2	Zugehörigkeit der MRSA-Isolate zum Clonal Complex 398.....	56
5.3	Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	56
5.4	Stammtypisierung ausgewählter MRSA-Isolate mittels Makrorestriktionsanalyse.....	57
5.4.1	Genotypische Charakterisierung und Clusteranalyse.....	58
5.5	DNA-Microarray Analyse.....	65
5.6	Proteinprofilcharakterisierung mittels MALDI-TOF-MS.....	70
5.6.1	Composite Correlation Index.....	71
5.6.2	Clusteranalyse zum Vergleich von Bakterienisolaten auf Proteinebene.....	75
6	DISKUSSION.....	81
6.1	Untersuchungen zur Emission von MRSA aus Nutztierhaltungen.....	81
6.1.1	<i>Spa</i> -Typisierung - und Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	82

6.1.2	Analyse der klonalen Verwandtschaft.....	85
6.2	Einschätzung der Tenazität emittierter und deponierter MRSA in der Stallumgebung von Schweinebeständen unter verschiedenen Umweltbedingungen.....	89
6.3	Anwendbarkeit unterschiedlicher Verfahren zur molekularbiologischen Typisierung.....	90
6.4	Relevante Pathogenitätsfaktor- und Antibiotikaresistenz-Genen ausgewählter MRSA-Isolate.....	92
6.5	Anwendbarkeit der <i>Cfr9I</i> -Makrorestriktionsanalyse in der MRSA-Typisierung im Vergleich zur MALDI-TOF-MS.....	95
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
8	SUMMARY.....	101
9	LITERATURVERZICHNIS.....	103
10	ANHANG.....	125
11	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	136
12	DANKSAGUNG.....	137
13	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	138