

# Molekulare Epidemiologie von MRSA-Patienten-Isolaten

DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Heike Süß  
geboren am 21.02.1982 in Gera

Mainz, 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2013

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
2.2 <i>Resistenzentwicklung und Virulenzfaktoren</i> .....	3
2.3 <i>Unterschiede zwischen ca- und haMRSA</i> .....	6
2.4 <i>Epidemiologie von MRSA</i> .....	8
2.5 <i>Diversität und Typisierung von MRSA</i> .....	11
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
3.1 <i>Materialien</i> .....	16
3.1.1 <i>Geräte und Hilfsmittel</i> .....	16
3.1.2 <i>Verbrauchsmaterial</i> .....	17
3.1.3 <i>Chemikalien</i> .....	18
3.1.4 <i>Gele, Puffer und Lösungen</i> .....	19
3.1.5 <i>Nährböden</i> .....	22
3.2 <i>Methoden</i> .....	23
3.2.1 <i>Patienten- bzw. Isolatauswahl</i> .....	23
3.2.2 <i>spa-Typisierung</i> .....	25
3.2.3 <i>PFGE-Typisierung</i> .....	29
3.2.4 <i>PVL-Gen-Detektion</i> .....	33
3.2.5 <i>Resistenztest</i> .....	34
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
4.1 <i>Molekularbiologische Untersuchungen der MRSA-Isolate</i> .....	36
4.1.1 <i>spa-Typisierung</i> .....	36
4.1.2 <i>PFGE</i> .....	46
4.1.3 <i>Untersuchungen zur caMRSA Detektion an der UMM</i> .....	55
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>75</b>
5.1 <i>Molekulare Epidemiologie von MRSA</i> .....	75
5.1.1 <i>Eignung der Typisierungsmethoden</i> .....	75

## *Inhaltsverzeichnis*

5.1.2 Auswertung der Typisierungsergebnisse .....	76
5.1.3 Anwendbarkeit von spa-Typisierung und PFGE bei Ausbruchsgeschehen .....	85
5.1.4 Einfluss der spa-Typ-Repeatlänge auf das epidemische Potential und die Virulenz .....	88
5.1.5 Fazit .....	91
5.2 Untersuchungen zum PVL-Status und der caMRSA Detektion an der UMM .....	92
5.2.1 Methodik zur Bestimmung klassischer PVL-positiver caMRSA .....	93
5.2.2 Verbreitung von caMRSA und PVL-positiven haMRSA an der UMM .....	96
5.2.3 Fazit .....	99
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>100</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>116</b>
<b>Vorveröffentlichung der Ergebnisse .....</b>	<b>134</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>135</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>136</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

BD	Becton Dickinson
bp	base pair (Basenpaar)
BURP	based upon repeat pattern (repeatbasiertes Clusterverfahren)
BURST	based upon related sequence types (basierend auf ähnlichen Sequenztypen)
CC	clonal complex (klonaler Komplex)
CL	Clindamycin
caMRSA	community associated MRSA (bevölkerungsassoziierter MRSA)
CNA	colistin nalidixic acid (Colistin Nalidixinsäure)
COL-S	Columbia-sheep blood (Columbia-Schafblut)
ccr	cassette chromosome recombinase (Kassenten-Chromosom-Rekombinase)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E	Erythromycin
EARS-Net	european antimicrobial resistance surveillance network (europäisches Netzwerk zur Überwachung mikrobieller Resistenzen)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA	european economic area (europäischer Wirtschaftsraum)
EUCAST	european committee on antimicrobial susceptibility testing (europäisches Komitee für antimikrobielle Resistenztests)
EXO I	Exonuclease I
FA	fusidic acid (Fusidinsäure)
FOX	Cefoxitin
GM	Gentamicin
haMRSA	hospital associated MRSA (krankenhausassoziierter MRSA)
hcaMRSA	hospital acquired community associated MRSA (im Krankenhaus erworbener aber bevölkerungsassoziierter MRSA)
HPLC	high-performance-liquid-chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
IE	internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
kb	kilo base (Kilobase)

## Abkürzungsverzeichnis

KH-Nr.	Krankenhaushygiene Einfriernummer des jeweiligen Isolates
KKM	Katholisches Klinikum Mainz
LVX	Levofloxacin
LZD	Linezolid
MLST	multilocus sequence typing
MRSA	Methicillin-/Multiresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillinsensible <i>Staphylococcus aureus</i>
NCTC	National Collection of Type Cultures (nationale Keimsammlung, England)
NGS	next generation sequencing (aktuellste Sequenzierungstechnik)
NRZ	Nationales Referenzzentrum
P	Penicillin
PBP	penicillin binding protein (Penicillinbindeprotein)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFGE	pulsed field gel electrophoresis (Pulsfeld-Gelelektrophorese)
PVL	Panton-Valentine-Leukocidin
R	resistent
®	Registered Trademark (eingetragenes Warenzeichen)
RA	Rifampin
REA	Restriktionsenzym-Analyse
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RKI	Robert Koch Institut
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
S	sensibel
SAP	shrimp alkaline phosphatase (alkalische Krabben-Phosphatase)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCC	<i>Staphylococcus</i> cassette chromosome (Staphylokokken-Kassetten-Chromosom)
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i>
SNP	single nucleotide polymorphism (Polymorphismus eines Nukleotids)
spa	<i>Staphylococcus</i> protein A (Staphylokokken-Protein A)
ST	sequence type (Sequenztyp)

## *Abkürzungsverzeichnis*

SXT	Sulfamethoxazol Trimethoprim auch bekannt als Cotrimoxazol
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tetracyclin
TEC	Teicoplanin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEN-Puffer	Tris-EDTA-Natriumchlorid-Puffer
T <sub>M</sub>	Temperaturmaximum für das Annealing
™	trademark (Warenzeichen)
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
u	unit (Einheit)
UMM	Universitätsmedizin Mainz
UPGMA	unweighted pair group method using arithmetic mean (ungewichtete Gruppierungsmethode anhand arithmetischer Mittelwerte)
VA	Vancomycin
VRE	vancomycinresistente Enterokokken

## **1. Einleitung**

*Staphylococcus aureus* ist einer der bedeutendsten bakteriellen Infektionserreger des Menschen. Als methicillinresistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist er weltweit bekannt und gefürchtet. Das Bakterium gehört zu den widerstandsfähigsten humanpathogenen Keimen überhaupt, so ist es beispielsweise in der Lage auf hydrophoben, nicht nahrhaften anorganischen Materialien wie Plastik und Stahl, sowie trockenem organischem Material mehr als 38 Wochen zu überleben [1; 2]. Gepaart mit der Eigenschaft, auf antibiotikabedingten Selektionsdruck mit Resistenzentwicklungen bis hin zur Multiresistenz zu reagieren, sind MRSA bestens an die Bedingungen in Krankenhäusern angepasst.

MRSA sind ein globales Problem, wobei große Unterschiede zwischen den vorherrschenden Typen einzelner Länder existieren. Einige Typen kommen nur in bestimmten Regionen vor, während andere eine pandemische Verbreitung erreicht haben [3] und auch innerhalb eines Landes können starke regionale Schwankungen existieren [4-7].

Da bisher für den Raum Mainz keine umfassenden Untersuchungen bezüglich der lokalen MRSA-Situation durchgeführt wurden, sollte dies in der vorliegenden Arbeit thematisiert werden. Hierfür wurden alle Erstisolate aus den Jahren 2004-2008 aus den Bereichen Infektions- und Besiedlungskeime mittels spa-Typisierung (*Staphylococcus* protein A typing, Staphylokokken-Protein A Typisierung) und PFGE (pulsed field gel electrophoresis, Pulsfeld-Gelelektrophorese) typisiert und phylogenetischen Analysen unterzogen. In diesem Zusammenhang wurden Isolate aus der Universitätsmedizin Mainz [8], als auch aus dem Katholischen Klinikum Mainz (KKM) miteinander verglichen, da Publikationen belegen, dass neben übereinstimmenden regionsspezifischen Klonen [9] ebenso Unterschiede zwischen Krankenhäusern eines Gebietes existieren können [10]. Die Ergebnisse aus beiden Kliniken sollten Erkenntnisse darüber liefern, ob innerhalb von zwei großen Krankenhäusern einer Stadt unterschiedliche MRSA vorherrschen, oder ob sogar ein regionsspezifischer Keim gefunden werden kann.

Die Daten beider Kliniken wurden außerdem genutzt, um die Hypothesen von FRÉNAVY *et al.* [11] zu prüfen. Diese postulierten, dass die Anzahl der Repeats eines spa-Typs mit dem epidemischen Potential eines Stammes korreliert und dass spa-Typen mit einer hohen Repeatzahl virulenter sind als andere.

Alle weiterführenden klinikspezifischen Betrachtungen wurden im Folgenden nur für die Isolate der UMM durchgeführt. So wurde untersucht, ob sich Unterschiede bezüglich des



## *Einleitung*

jährlichen Vorkommens der häufigsten MRSA-Typen ergeben um Rückschlüsse auf Dynamiken in der Populationsstruktur zu erhalten. Außerdem wurde analysiert, ob es sich bei MRSA, die Infektionen verursachen, und denen, die als Besiedlungskeim auftreten, um abweichende Typen handelt. Weiterhin wurden alle Isolate der UMM auf das Vorhandensein des Panton-Valentine-Leukocidin-Gens (PVL-Gen) getestet um daraus in Kombination mit Resistenztestungen und Typisierungen den Anteil von sogenannten community associated MRSA (caMRSA) zu ermitteln, welche weltweit gesehen ein immer größeres Problem darstellen. Anhand der Ergebnisse wurde ein Schema zur Detektion von klassischen PVL-positiven caMRSA entwickelt, welches eine Vorselektion potentieller caMRSA mittels routinediagnostischer Methoden ermöglicht.

## **2. Grundlagen**

### **2.1 *Staphylococcus aureus***

Die Entdeckung von Staphylokokken reicht bis 1882 zurück, als OGSTON [12] diese Bezeichnung für Mikroorganismen vergab, die er als Hauptgrund für eitrige Wundinfektionen ansah.

1884 wurden die Staphylokokken von ROSENBACH [13] ihrer Pigmentierung nach in *aureus* und *albus* Stämme unterteilt, doch erst mit der Entwicklung des Plasmakoagulationstests durch CHAPMAN [14] war es möglich, die Gattung *Staphylococcus* in Koagulase positive- (z. B. *S. aureus*, *S. intermedius*) und Koagulase negative Staphylokokken (z. B. *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) zu unterscheiden [15].

*S. aureus* gehört zu den nicht-sporenbildenden, unbeweglichen, gram-positiven, kokkoiden Bakterien mit niedrigem Guanin-Cytosin-Gehalt (33-40 %). Es ist fakultativ anaerob, wächst bei Temperaturen von 15-45 °C und toleriert bis zu 15 % NaCl [16]. Auf bluthaltigen Nährböden bildet *S. aureus* glänzende, runde Kolonien mit einem Durchmesser bis zu 3 mm. Die Pigmentierung reicht von weiß-grau bis gold-gelb, daher auch der Name *aureus* (lat. = golden). Oftmals ist ein schwacher bis sehr starker Hämolysehof sichtbar, es existieren jedoch auch Stämme ohne Hämolysebildung, je nachdem wie viel Hämoglobinabbauendes Hämolysin gebildet wird.

### **2.2 Resistenzentwicklung und Virulenzfaktoren**

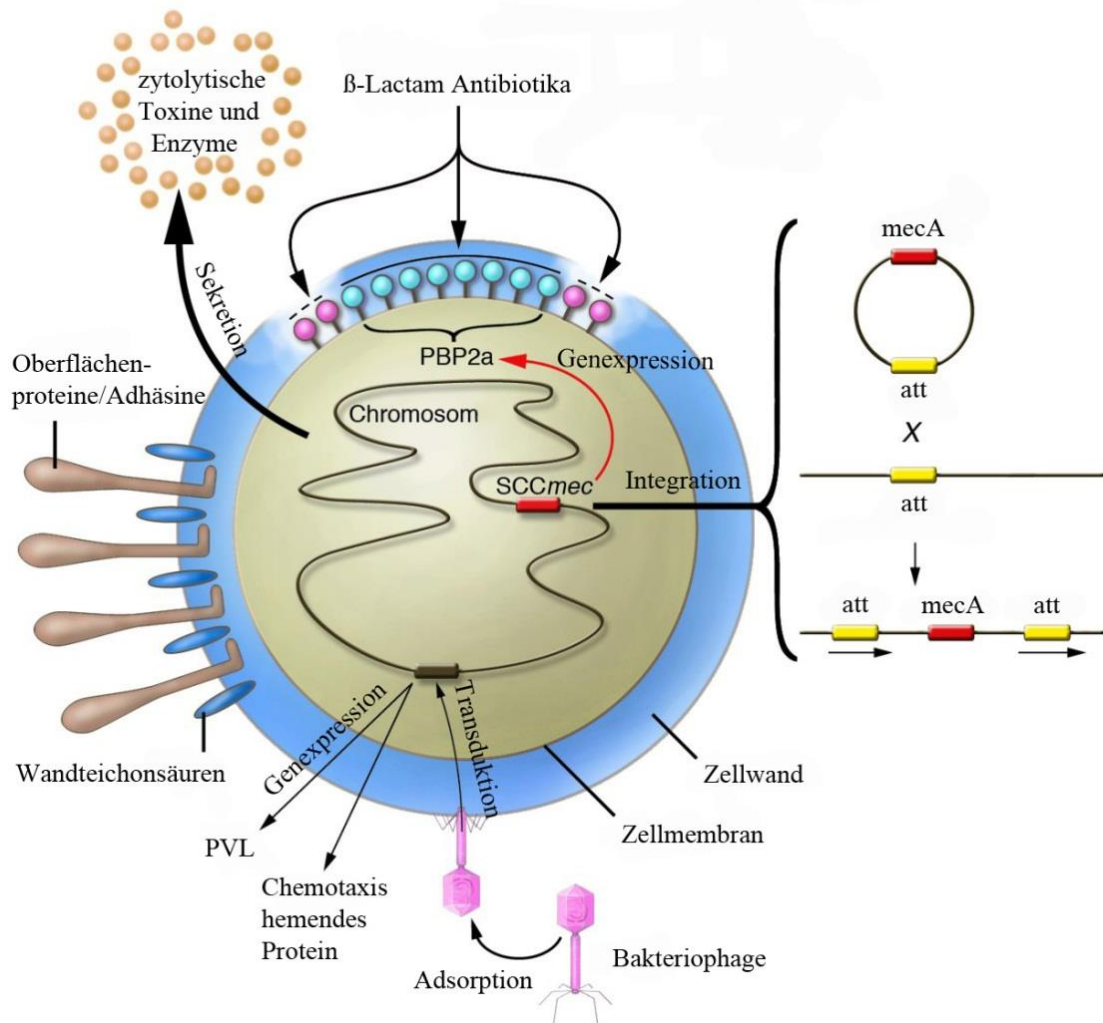
Mit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1928 und der therapeutischen Verwendung seit 1940, begann die Resistenzentwicklung von *S. aureus*. Schon 1942 trat die erste Penicillinresistenz auf [17]. Resultierend aus dem Erwerb eines Plasmids, welches für ein penicillinhydrolysierendes Enzym (Penicillinase bzw. Betalactamase) kodiert, sind einige *S. aureus* fortan in der Lage, den  $\beta$ -Lactam-Ring penicillinbasierter Antibiotika zu spalten, wodurch diese ihre Wirksamkeit verlieren [18].

1961 kam das erste penicillinasefeste Antibiotikum Methicillin auf den Markt, gegen welches kurz darauf in England die ersten Resistenzen auftraten [19]. Die Methicillinresistenz wird in Form des PBP2a (penicillin binding protein, Penicillinbindepotein) vom *mecA*-Gen kodiert [20]. Der sogenannte *mec*-Komplex beinhaltet das *mecA*-Gen, verschiedene Regulatorgene und spezifische Insertionssequenzen. Zusammen mit dem *ccr*-Komplex (cassette chromosome

## Grundlagen

recombinase, Kassetten-Chromosom-Rekombinase), welcher spezifische Rekombinasen enthält, bilden beide Genkomplexe das mobile Genelement mit der Bezeichnung SCCmec (*Staphylococcus cassette chromosome*, Staphylokokken-Kassetten-Chromosom) [21]. Je nachdem welche Kombination unterschiedlicher ccr- und mec-Komplexe vorliegt, werden zurzeit acht unterschiedliche SCCmec-Typen (I-VIII) und einige Subtypen unterschieden [3; 21]. Alle SCCmec-Typen können durch horizontalen Gentransfer und spezifische Integration an die gleiche Stelle in das Bakteriengenom integriert werden [21]. Verantwortlich dafür ist die chromosomale Ziel-Extraktions-Integrationsfrequenz welche den SCCmec Genabschnitt flankiert (in Abbildung 1 „att“ genannt). Diese att-Abschnitte kennzeichnen den Bereich, aus dem das SCCmec-Element ausgeschnitten und nach der Übertragung in ein anderes Bakterium wieder chromosomal integriert wird [22]. Nach der Integration des SCCmec-Elementes ist der Keim in der Lage das zusätzliche PBP2a zu bilden. PBP2a hat eine sehr geringe Affinität zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und synthetisiert selbst dann noch Peptidoglycan für die Zellwandsynthese, wenn die normalerweise vorhandenen drei Penicillinbindeproteine (PBP 1, 2 und 3) durch Bindung an Antibiotika inhibiert sind [15].

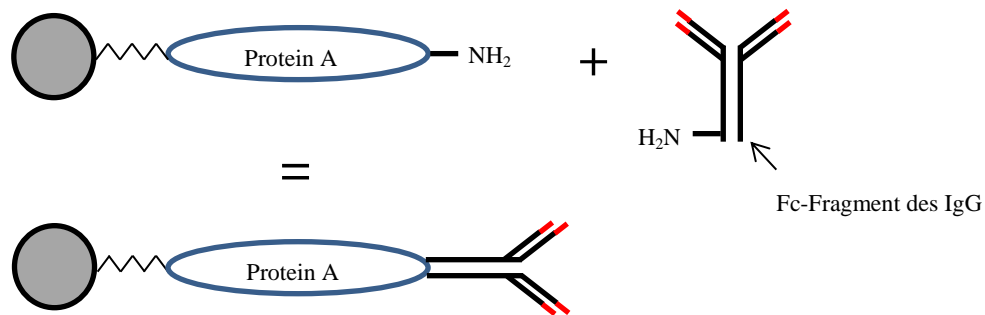
Die methicillinresistenten *S. aureus* wurden fortan mit der Bezeichnung MRSA abgekürzt, wobei das Kürzel im allgemeinen Sprachgebrauch vor allem auf die Multiresistenz des Keims anspielt, denn *S. aureus* können Resistenzen gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Antibiotikaklassen erwerben. Eine Sensibilität wird oft nur für Glycopeptide (Vancomycin und Teicoplanin) und neu entwickelte oder experimentelle Antibiotika festgestellt [23]. Es gibt kein einheitliches Resistenzmuster und selbst die Raten, mit welchen bestimmte Resistenzen häufiger auftreten, variieren von Klinik zu Klinik und von Land zu Land [23]. So werden z. B. für Clindamycin Raten von 30-100 % angegeben [24-27].



**Abbildung 1** Übersicht der chromosomalen Integration von Methicillinresistenz und phageninduzierten Virulenzfaktoren, abgewandelt aus FOSTER [28].

Doch nicht nur die Resistenzeigenschaften sind kennzeichnend für MRSA, sondern auch der Besitz verschiedener Virulenzfaktoren. Diese können beispielsweise durch die Integration von Bakteriophagen-DNA (deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure) in das Bakteriengenom erworben werden oder auch intrinsisch sein.

Einer der bekanntesten Virulenzfaktoren ist das zellwandassoziierte Protein A. Dieses wird vom *spa*-Gen kodiert, dessen polymorphe X-Region für die *spa*-Typisierung genutzt wird. Protein A gilt als Virulenzfaktor, da es die Bakterien vor der Immunantwort des befallenen Organismus schützt und somit den Zelltod verhindert [11]. Die Protein A-Domäne bindet an das Fc-Fragment des Antikörpers IgG (Immunglobulin G) (siehe Abbildung 2); derart mit den wirtseigenen Antikörpern bestückt, verhindert das Bakterium eine Erkennung durch das Immunsystem des Wirtsorganismus.



**Abbildung 2** Vereinfachte schematische Darstellung der Bindung von Protein A mit dem Fc-Fragment des IgG, abgewandelt nach Chemicell [29].

Beispiele für Virulenzfaktoren viralen Ursprungs sind die Gene für PVL oder das Chemotaxis hemmende Protein, welche durch Bakteriophagen in die chromosomale Bakterien-DNA eingeschleust werden [30; 31] (siehe Abbildung 1). Durch die Aktivierung chromosomaler Gene (egal ob bakteriellen- oder viralen Ursprungs) ist das Bakterium in der Lage, Adhäsine und Wandteichonsäuren zu exprimieren sowie Toxine und Enzyme zu sekretieren [28].

Das erwähnte PVL-Gen kodiert für ein porenbildendes Toxin bestehend aus zwei Proteinen (lukS-PV und lukF-PV), welche synergistisch wirken, um hochspezifisch an polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen zu binden [32]. Der so verursachte Zelltod geht meist mit einer großflächigen Gewebsnekrose einher, welche dem PVL-Gen zugeschrieben wird [33-35]. Bisher konnten sechs unterschiedliche PVL-Phagen detektiert werden, welche in unterschiedlichsten klonalen Komplexen vorkommen [30]. Der Nachweis des Gens ist eng assoziiert mit caMRSA.

### 2.3 Unterschiede zwischen ca- und haMRSA

MRSA wurden bekannt als nosokomiale Keime, doch seit ca. 1990 häufen sich Fälle mit MRSA-Infektionen, die keinen nosokomialen Ursprung aufweisen und vor allem gesunde junge Menschen ohne Risikofaktoren betreffen. Allgemein sind diese Infektionen durch einen schnellen, heftigen Verlauf gekennzeichnet, bedingt durch höhere Vermehrungsraten und weniger Resistenzen als haMRSA [36]. Eine Zusammenfassung der Unterschiede ist in Tabelle 1 aufgeführt. Zu beachten ist, dass die in den USA beobachteten caMRSA-Risikogruppen aufgrund der geringen caMRSA-Prävalenz bisher nicht auf Deutschland übertragbar sind [37].

epidemiologische Charakteristika	haMRSA	caMRSA
<b>gehäuftes Vorkommen</b>	Krankenhäuser Pflege-/Altenheime	junge, gesunde Individuen ohne Risikofaktoren für haMRSA (bei Krankenhausaufenthalt Diagnose innerhalb von 48 h)
<b>Art der Infektionen</b>	Bakteriämie und Wundinfektionen symptomatische Infektionen des Respiratorischen- und Harntraktes	hauptsächlich Haut- und Weichgewebeanfektionen seltener septischer Schock, Bakteriämie und nekrotisierende Pneumonie
<b>Risikofaktoren</b>	Katheter, Anschlüsse Dialyse Langzeitantibiotikagabe lange Krankenhausaufenthalte	enger physischer Kontakt Schürfwunden gemeinschaftlich genutzte Dinge/ Örtlichkeiten
<b>Übertragung/Risikogruppen</b>	zwischen Patienten und Personal über Medizinprodukte	zwischen Sportlern, Inhaftierten, Homosexuellen, Obdachlosen, Armeangehörigen, ethnischen Minderheiten, Drogensüchtigen
<b>Wachstumsrate</b>	langsam	schneller als haMRSA
<b>mikrobiologische Charakteristika</b>		
<b>resistent gegen <math>\beta</math>-Lactame</b>	ja	ja
<b>resistent gegen weitere Antibiotika</b>	ja, bis zur fast vollständigen Resistenz gegen die verfügbare Präparatpalette	häufig nur gegen $\beta$ -Lactame oder zusätzlich ein bis zwei weitere Antibiotika
<b>PVL-positiv</b>	$\leq 5\%$	$\geq 95\%$
<b>SCCmec-Typ</b>	hauptsächlich Klasse I, II & III	hauptsächlich Klasse IV, V, VII

**Tabelle 1** Vergleich von in der Literatur benannten Charakteristika von ca- und haMRSA (Zusammengefasst aus BOAKES *et al.* [30], RKI (Robert Koch Institut) [38], MILLAR *et al.* [39], DEURENBERG [40], EADY UND COVE [41]).

Zu Beginn der ersten caMRSA-Infektionen unterschieden sich diese neuen MRSA sowohl epidemiologisch als auch genetisch von den bekannten haMRSA und wurden daher als voneinander unabhängig angesehen [42]. Doch nur kurze Zeit später tauchten weltweit unterschiedlichste Stämme auf [9; 43; 44]. Mittlerweile sind zwei Jahrzehnte vergangen und die Situation hat sich grundlegend geändert. haMRSA kursieren in der Bevölkerung [45-48], die Zahl nosokomialer Infektionen mit caMRSA nimmt stetig zu [49; 50], bis hin zur Verdrängung lokaler haMRSA [49; 51; 52] und einige caMRSA Stämme werden zunehmend resistenter [8; 53-55]. Eine Übersicht aktueller caMRSA, welche Literaturquellen bis Mai 2012 beinhaltet, stellten MEDIAVILLA *et al.* [56] zusammen, wobei leider der PVL-Status der Keime nicht erwähnt wird.

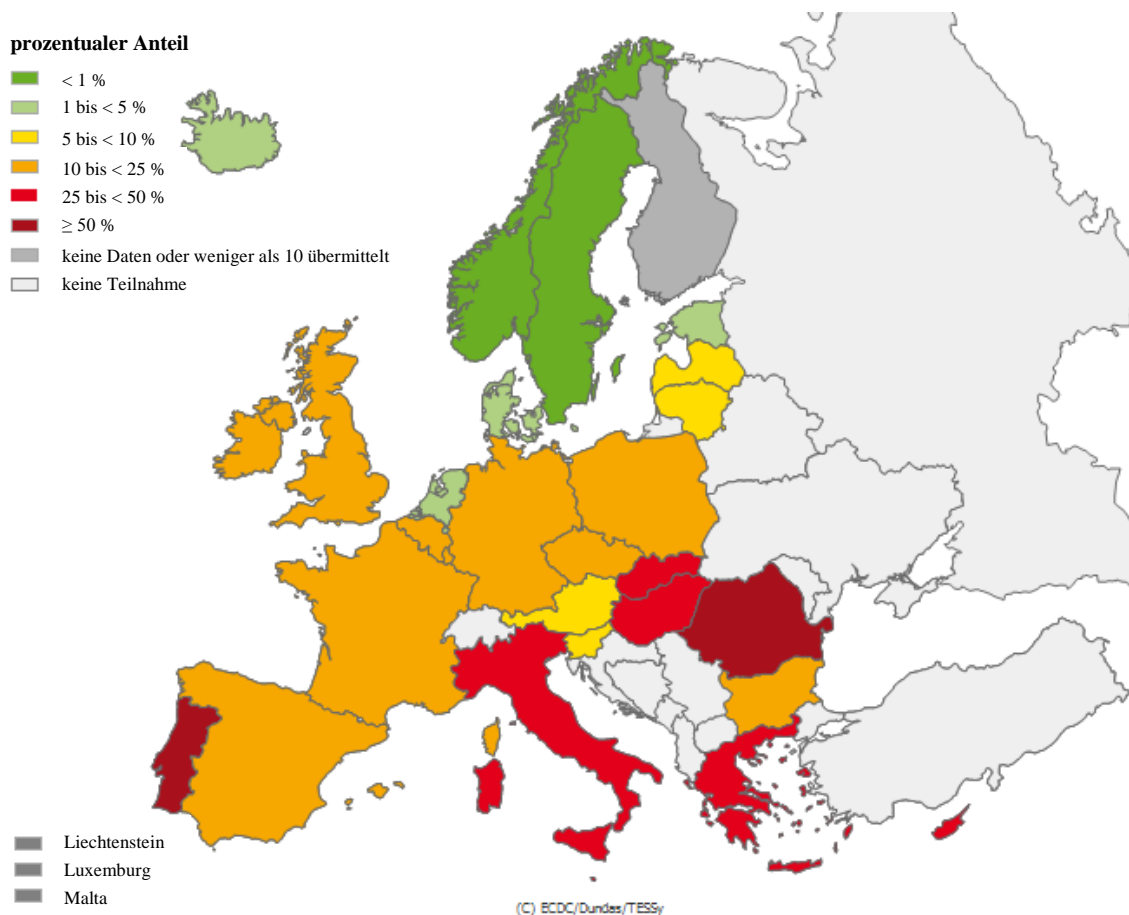
Aus den genannten Entwicklungen resultiert eine ständig fortschreitende Verwischung der ehemals so deutlichen klinisch-epidemiologischen Grenzen, die somit sukzessive an Relevanz

verlieren [9; 39]. CHUA *et al.* [9] postulieren, dass es aktuell keine Definition für caMRSA gibt, welche zuverlässig zwischen ha- und caMRSA unterscheiden kann. Sie liefern in ihrer Arbeit eine Zusammenfassung der Definitionen verschiedenster Autoren und als Grund für die Probleme sehen sie eine synonyme Verwendung des Begriffs caMRSA. So wurde dieser Ausdruck beispielsweise verwendet, um die Quelle einer Infektion zu beschreiben, aber auch für den Antibiotikaphänotyp und den Genotyp des Keims. Dies führte zwangsläufig zu den unterschiedlichsten Ergebnissen, welche Keime als caMRSA anzusehen sind und welche nicht. TACCONELLI *et al.* [57] belegten in ihrer Studie, dass es zu einer Überschätzung der caMRSA-Anzahl kommt, wenn lediglich die epidemiologischen Patientendaten zur Differenzierung genutzt werden. Bei O'BRIEN *et al.* [58] resultierte eine Untersuchung basierend auf nicht vorliegender Multiresistenz und der Bedingung, dass die Keime aus der Bevölkerung isoliert wurden, in sehr vielen caMRSA aus klonalen Komplexen, die sonst nicht mit caMRSA assoziiert werden. Ähnlich widersprüchliche Ergebnisse tragen DAVID & DAUM [43] in ihrer umfassenden Publikation zur Epidemiologie und klinischen Konsequenzen von zunehmenden caMRSA-Detektionen zusammen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Differenzierung von ca- und haMRSA auf epidemiologischer Basis nicht zufriedenstellend ist. Es fehlen klare molekularbiologische Vorgaben, welche Keime aufgrund welcher genetischen Ausstattung oder auch phylogenetischen Abstammung als caMRSA anzusehen sind. OTTER & FRENCH [59] empfehlen daher, die genotypischen Aspekte von caMRSA für eine Differenzierung zu nutzen.

### 2.4 Epidemiologie von MRSA

MRSA ist der bekannteste Verursacher nosokomialer Infektionen. Der Keim ist in der Lage, Haut und Schleimhäute von Menschen und unterschiedlichsten Tierarten zu besiedeln [60]. Laut FOSTER [28] sind ca. 20 % der Bevölkerung ständig mit *S. aureus* nasal kolonisiert, 60 % sind intermittierende Träger und 20 % tragen diesen Keim niemals in ihrem Leben. Longitudinale Studien kommen zu etwas schwankenden prozentualen Angaben, so sollen zwischen 12-30 % der Menschen persistierende *S. aureus*-Träger sein, zwischen 16-70 % diskontinuierliche Träger und 16-69 % weisen keine Besiedlung auf [61-64]. Die starken prozentualen Schwankungen resultieren aus Unterschieden bezüglich der Kulturtechnik, Studienpopulation und Auswertung [65].

Seit der Entdeckung von *S. aureus* Ende des 19. Jahrhunderts breitete sich dieser Keim rasant auf dem ganzen Globus aus. Laut den Daten der EARS-Net Database zeigte sich 2008/2009 erstmals in einigen europäischen Ländern ein Rückgang des prozentualen MRSA-Anteils in Blutkulturen, wodurch das Erreichen einer stabilen Phase und sogar ein Rückgang von MRSA in diesen Staaten angenommen wird. Diese Entwicklung hält bis zur aktuell verfügbaren Statistik (2011) an, und trotzdem ist das Vorkommen von MRSA in Blutkulturen immer noch in 1/3 der europäischen Länder über 25 %, und auch an dem seit Jahren in Europa existierenden MRSA-Nord-Süd-Gefälle hat sich nichts geändert. So weisen die nordischen Länder und die Niederlande lediglich 1 bis < 5 % MRSA in Blutkulturen auf, während Richtung Süden der prozentuale Anteil teilweise auf  $\geq 50$  % (z. B. Portugal) ansteigt (siehe Abbildung 3). Diese gegensätzlichen Trends ergeben sich aus regionalen Unterschieden in der angewandten Hygiene, der mehr oder weniger exzessiven Verschreibung inklusive der Auswahl verschriebener Antibiotika, aber auch aus der Prävalenz bestimmter Genotypen.



**Abbildung 3** Prozentualer Anteil von MRSA in Blutkulturen in der EU bzw. den EEA-Ländern (european economic area, europäischer Wirtschaftsraum: EU Länder inklusive Island, Liechtenstein, Norwegen) aus dem Jahr 2011. Modifiziert nach [66].



Weltweit betrachtet gibt es, trotz der positiven Entwicklungen in Europa, Länder, in welchen MRSA und vor allem caMRSA permanent eine immer stärkere Ausbreitung erreichen und wo haMRSA durch caMRSA verdrängt werden [49; 51; 52]. Für die Jahre 2005, 2007 und 2008, also während des Untersuchungszeitraums der vorliegenden Dissertation, veröffentlichte das RKI [5] die in Tabelle 2 aufgeführten Daten zur Dynamik des Auftretens von epidemischen haMRSA mit überregionaler Verbreitung in Krankenhäusern in Deutschland, beruhend auf Einsendungen an das NRZ in den entsprechenden Jahren. Die klonalen Linien (ST = sequence type, Sequenztyp) werden dabei durch die Sequenzanalyse von sieben Housekeeping-Genen bestimmt, welche dann mittels BURST-Analyse (based upon related sequence types, basierend auf ähnlichen Sequenztypen) klonalen Komplexen (CC) zugeordnet werden [67]. Diese Methode heißt MLST (multilocus sequence typing). Die Ermittlung der spa-Typen für einzelne klonale Linien ermöglicht eine weitere Unterscheidung in Subklone. Ein Rückschluss vom spa-Typ auf die Zugehörigkeit zu einem CC/ST ist „über begrenzte Zeiträume und geografische Regionen gut möglich, darüber hinaus sind tiefer gehende Analysen erforderlich, da bei MRSA bestimmte klonale Linien offenbar unabhängig voneinander durch weit verbreitete und empfindliche Vorläufer entstehen können (z. B. MRSA ST5).“ [5].

klonaler Komplex	klonale Linie	2005	2007	2008
CC8	ST8, t008	*	39 %	13,6 %
CC8	ST247, t052	0,2 %	0,7 %	1,6 %
CC8	ST239, t037	0 %	2 %	2,6 %
CC8	ST398	0 %	2,6 %	1,6 %
CC5	ST228, t001	6,2 %	9 %	5 %
CC5	ST5, t002	21 %*	10,2 %	2,6 %
CC5	ST225, t003		47 %	38 %
CC22	ST22, t002, t005, t032	35,5 %	60 %	46 %
CC45	ST45	8,6 %	3,1 %	13,6 %
CC30	ST36	0,3 %	0,7 %	3,1 %
<b>Anzahl Krankenhäuser mit Epidemiestämmen</b>		194	151	191

**Tabelle 2** Dynamik des Auftretens von epidemischen MRSA mit überregionaler Verbreitung in Krankenhäusern in Deutschland, beruhend auf Einsendungen an das NRZ 2005, 2007 und 2008 (die Angaben in % beziehen sich auf die Anzahl der von diesen MRSA betroffenen Krankenhäuser). \* Erst die seit 2006 im NRZ Staphylokokken eingeführte spa-Typisierung gestattet eine Unterscheidung von ST8 sowie von ST5 und ST225 (spa-Typen t002 bzw. t003). Quelle: [5].

Die Einführung der spa-Typisierung im NRZ 2006 ermöglichte erstmals eine Differenzierung bestimmter klonaler Linien. Daraus resultierte unter anderem die Unterscheidung des sogenannten Rhein-Hessen-Stamms in Subklone (t002 und t003). t003 wurde nach den Isolaten der klonalen Linie ST22 (dem sogenannten Barnim-Stamm) der zweithäufigste Epidemiestamm unter den eingesandten Isolaten [5]. Die beiden spa-Typen t003 und t032 zählen nicht nur zu den häufigsten MRSA Deutschlands, sondern zu den häufigsten weltweit, wie aus den Daten des Ridom SpaServers (siehe Tabelle A 1) ersichtlich ist. MONECKE *et al.* [3] sprechen sogar von pandemischen Klonen. Das Auftreten des Barnim- und des Rhein-Hessen-MRSA in Deutschland wird in der Publikation von STROMMINGER *et al.* [7] erstmalig 1998 bzw. 2001 dokumentiert. Sie erfassten von 1994-2002 das Vorkommen und die Verteilung von epidemischen MRSA in deutschen Krankenhäusern und konnten zeigen, dass die Persistenz von bestimmten Klonen ein sehr dynamischer, veränderlicher Prozess ist. Von einer verstärkten Detektion von caMRSA, geschweige denn von einem Eindringen dieser Keime in deutsche Krankenhäuser kann bis heute nicht gesprochen werden [37].

### 2.5 Diversität und Typisierung von MRSA

Von klonaler Diversität bei Bakterien wird gesprochen, wenn genetische Unterschiede zwischen Isolaten der gleichen Art auftreten, die eine Unterscheidung ermöglichen und auf deren Grundlage die Rekonstruktion von Infektionsgeschehen erfolgen kann. Lässt sich die Entstehung der Art auf einen bestimmten Ur-Typ zurückführen, so liegt ein monoklonaler Ursprung vor, können jedoch mehrere genetische Unterschiede und eventuell sogar ähnliche Evolutionsereignisse unterschiedlichen Ursprungs benannt werden, so liegt ein polyklonaler Ursprung vor. Für MRSA wird letzterer postuliert, wobei die genauen evolutionären Abläufe noch ungeklärt sind [51; 68].

Die Diversität lässt sich anhand unterschiedlicher Typisierungsmethoden feststellen, welche phänotypische- und genotypische Verfahren beinhalten können. Während eine Phänotypisierung eine Unterscheidung anhand des äußeren Erscheinungsbildes und der Ausprägung bestimmter Eigenschaften vornimmt, bezieht sich die Genotypisierung auf die Erstellung eines sogenannten genetischen Fingerabdrucks, mit welchem DNA-Polymorphismen nachgewiesen werden können.

Eine Zusammenfassung phänotypischer Typisierungsmethoden lieferten WICHELHAUS *et al.* [69]. Sie benannten die Antibiotikaresistenztestung, Serotypisierung (Nachweis antigener

## Grundlagen

Determinanten mit Antikörpern), Biotypisierung (Untersuchung biochemischer StoffwechsellLeistungen z. B. per BBL™ Crystal™), Lysotypie (Phagentypisierung), Proteintypisierung (Nachweis spezifischer Proteine via Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder Immunoblotting) und Multilokus-Enzym-Elektrophorese (gelelektrophoretische Auftrennung von Enzymen). Phänotypische Typisierungsmethoden sind durch die variable Expression der Genprodukte sehr störungsanfällig, denn Änderungen der Temperatur, des Nährstoffangebotes oder auch des pH-Wertes haben einen direkten Einfluss auf die Genexpression und somit auch auf den Phänotyp. Geeignete Methoden zur Typisierung beruhen daher auf genotypischen Grundlagen, welche eine Stammunterscheidung ermöglichen. Die Bandbreite der zur Verfügung stehenden Methoden ist groß und reicht von leichtem bis hohem Schwierigkeitsgrad und geringen bis hohen Kosten (siehe Tabelle 3).

Methode	Typisierbarkeit/ Reproduzierbarkeit/ Diskriminationspotential	Vorteile
		Nachteile
<b>Plasmid-Analyse</b>	variabel/gut/mäßig	einfache Durchführung, preiswert  Plasmide sind instabile genetische Elemente
<b>Restriktionsenzym-Analyse</b>	alle/mäßig-gut/gut	einfache Durchführung, schnell, preiswert  schwierige Interpretation
<b>Ribotypisierung</b>	alle/gut/gut	einfache Interpretation  aufwendige Durchführung
<b>PFGE</b>	alle/gut/exzellente	einfache Interpretation  aufwendige Durchführung, kostenintensiv
<b>PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (PCR-RFLP)</b>	alle/gut/mäßig-gut	einfache Interpretation und Durchführung, preiswert  kaum angewandte Methode
<b>Amplifizierter-Fragment-Längen-Polymorphismus (AFLP)</b>	alle/gut/gut	einfache Interpretation  aufwendige Durchführung
<b>Sequenzierungen (z. B. spa-Typisierung, MLST, „whole genome“ mittels next generation sequencing kurz NGS)</b>	alle/gut/exzellente	einfache Interpretation  aufwendige Durchführung, kostenintensiv

**Tabelle 3** Beurteilung genotypischer Typisierungsmethoden, abgewandelt aus WICHELHAUS *et al.* [69].

Unter allen erwähnten Methoden zählen die PFGE, die spa-Typisierung und die MLST zu den für die Typisierung von MRSA am häufigsten genutzten Verfahren. Die „whole genome“ Sequenzierung ist unter allen Verfahren das jüngste und zu teuer für kleinere Forschungslabore, vor allem da es noch keine kommerzielle Auswertungssoftware für die enorme Datenmenge gibt.

Mittels MLST werden bisher die Zuordnungen zu klonalen Komplexen durchgeführt. Die Allele von sieben Housekeeping-Genen werden dabei mit schon bekannten Allelen aus der MLST-Datenbank verglichen und nummerisch benannt. Aus diesem Kode ergibt sich ein eindeutiger Sequenztyp (ST). Die Allelprofile der Sequenztypen können mittels des BURST-Algorithmus auf vorliegende paarweise Unterschiede untersucht und klonalen Komplexen zugeordnet werden [67].

Eine weitere Differenzierung der Sequenztypen wird mittels spa-Typisierung erreicht. Die spa-Typisierung ist eine Sequenzanalyse der sogenannten X-Region innerhalb des Protein A-Gen. Bei der X-Region handelt es sich um einen variablen Bereich im ansonsten hochkonservierten Protein A-Gen, welcher sich durch 21-27 Basenpaare lange, sich wiederholende Sequenzabschnitte (sog. Repeats) auszeichnet. Die Individualität eines Stammes ergibt sich somit aus der Nukleotidsequenz, aber auch aus der Abfolge einzelner Repeats. Varianzen resultieren aus intragenomischen Rekombinationsvorgängen wie Punktmutationen und Indels. Die Auswertung der DNA-Sequenz erfolgt mittels der Ridom StaphType Software, in welche die Sequenz-Chromatogramme eingelesen werden. Das Programm erkennt automatisch jeden Repeat, versieht ihn mit einem alpha-numerischen Code (z. B. r25) und erstellt die Repeatabfolge, welche den spa-Typ bedingt. Die Ergebnisse können via Internetverbindung an den Ridom spa-Server ([www.spaserver.ridom.de](http://www.spaserver.ridom.de)) übermittelt werden, wodurch auch neuen Repeats und spa-Typen eine einheitliche Nomenklatur zugewiesen und die weltweite Datenbank aktualisiert wird. Da jede genomische Veränderung der X-Region einen neuen Repeat und somit zwangsläufig einen neuen spa-Typ bedingt, ist eine phylogenetische Auswertung nur mittels des sogenannten BURP-Algorithmus (based upon repeat pattern, repeatbasiertes Clusterverfahren) der StaphType Software möglich. Die Verwandtschaftsverhältnisse von MRSA werden dabei anhand von spa-Polymorphismen dargestellt [70]. Von einem spa-Typ kann zwar auf die Zugehörigkeit zu einem CC/ST geschlossen werden, da jedoch bestimmte klonale Linien scheinbar unabhängig voneinander entstanden sind, sollten für umfangreiche Arbeiten und detaillierte Aussagen weitere Differenzierungen erfolgen [5].

Die spa-Typisierung wird in vielen Studien trotz der Beschränkung auf nur einen Marker als fast gleichwertige Typisierungsmethode im Vergleich zur PFGE, bzw. als sinnvolle Ergänzung angesehen [71-74]. Die PFGE gilt bis heute aufgrund der hohen Diskriminationsfähigkeit als Goldstandard [49; 75; 76] und wurde 1984 ursprünglich für die Typisierung von Hefen entwickelt [77]. Seit dem wurden immer neue Protokolle für andere Organismen/Bakterien erforscht und modifiziert. Für die MRSA-PFGE wird das Bakterium in einen Agaroseblock eingebracht. Alle nachfolgenden Schritte wie Lyse der Bakterienzellwand, Waschschritte und der Restriktionsverdau erfolgen zum Schutz vor DNA zerstörenden Scherkräften in diesem Block. Nach einer Behandlung mit selten-schneidenden Restriktionsenzymen (hauptsächlich SmaI) wird der Agaroseblock mit der geschnittenen chromosomalen DNA in die Taschen eines Agarosegels gegeben. Dabei kommen jeweils in die erste, mittlere und letzte Tasche ein NCTC 8325 (National Collection of Type Cultures, nationale Keimsammlung, England) Plug als Größenmarker. Das bestückte Gel wird in eine mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht, umgeben von Elektroden, welche das gepulste Feld erzeugen. Das Laufergebnis hängt von vielen Parametern ab. Durch Veränderungen der Puffer- und Agarosegellkonzentration, der Puffer-Temperatur, der Spannung und der Pulszeiten kann der Lauf beschleunigt oder verlangsamt werden. Da mittels der PFGE DNA-Fragmente von 10-2000 kb (kilo base, Kilobase) aufgetrennt werden, beträgt die Laufzeit prinzipiell mehrere Stunden. Die Ausrichtung der Fragmente erfolgt vertikal der Größe nach und bildet ein sogenanntes Banden- oder auch Restriktionsmuster (siehe Abbildung 4). Die Interpretation erfolgt anhand der Kriterien von TENOVER *et al.* [78] und beinhaltet die Beurteilung welche genetischen Events zu welchen Bandenunterschieden führen und wie diese phylogenetisch zu bewerten sind.

Die Kombination von PFGE und spa-Typisierung bietet verschiedene Vorteile. Für lokalepidemiologische- oder Ausbruchuntersuchungen wird die Verwendung einer hochdiskriminierenden Methode empfohlen, welche Veränderungen schnell akkumuliert (z. B. PFGE). Für die Analyse von Langzeitstudien oder die Betrachtung globaler epidemiologischer Geschehen, wie die Verbreitung von bestimmten klonalen Linien wird hingegen zu einer Methode geraten, welche hochdiskriminierend ist, doch der verwendete Marker nur einer langsamen genetischen Veränderung unterliegt (z. B. spa-Typisierung) [79; 80]. Laut KOREEN *et al.* [81] kann die spa-Typisierung sowohl für Langzeit- als auch Kurzzeitstudien verwendet werden, da die Zuordnung von unterschiedlichen Abstammungslinien eher via Nukleotidmutationen erfolgt, während innerhalb einer klonalen

## *Grundlagen*

Linie häufiger Variationen durch Polymeraseslippage, und somit Insertionen und Deletionen von Repeats, auftreten. Ausgangspunkt dieser Theorie ist die wesentlich geringere Rate von Punktmutationen, im Gegensatz zu Repeatnummervariationen. Durch die mit einer Methode darstellbaren Mikro- und Makrovariationen eignet sich die spa-Typisierung sowohl für lokale als auch globale und langzeitepidemiologische- als auch populationsbezogene Studien. Die PFGE gilt je nach Autor als Methode der Wahl für Ausbruchsgeschehen [82; 83], kann aber aufgrund der chromosomalen Stabilität und vergleichsweise niedrigen Polymorphismusrate auch für Langzeitstudien eingesetzt werden [84; 85]. Somit erscheinen beide Methoden für die Untersuchung lokaler Gegebenheiten als geeignet, insbesondere da eine kombinierte Anwendung (auch mit anderen Methoden) empfohlen wird wenn hoch klonale MRSA vorherrschend sind [86; 87].

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Materialien**

##### **3.1.1 Geräte und Hilfsmittel**

- Abzug HERAsafe (Kendro, Langenselbold)
- Analysewaagen:
  - Feinwaage TE64 (sartorius AG, Göttingen)
  - Scout 200II (Ohaus, Kirchheim)
- Antibiotikastempel (Becton Dickinson (BD) GmbH, Heidelberg)
- Brutschrank kelvitron<sup>®</sup> t (Heraeus GmbH, Hanau)
- Chef DRIII PFGE-Gerät (Bio-Rad, München)
- Datenbanken und Software:
  - Gelkamera-Bedienungssoftware BioDoc Analyze 2.1 (Biometra, Göttingen)
  - EARS-Net (european antimicrobial resistance surveillance network, europäisches Netzwerk zur Überwachung mikrobieller Resistenzen): <http://www.rivm.nl/earss/>
  - EndNote X5 (Thomson Reuters, New York, USA)
  - GelCompar<sup>®</sup> II Version 4.5 (2005, Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgien)
  - Microsoft Office Professional Plus 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
  - Oligoanalyzer 3.1: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>
  - Photoshop CS5v (Adobe Systems Software Ireland Limited, Irland)
  - Primer3Plus: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
  - PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>
  - Ridom SpaServer: <http://spaserver.ridom.de/>
  - Ridom StaphType Version 1.1.17 (RIDOM GmbH, Würzburg)
  - Splits Tree4 Version 4.12.6 (Eberhard Karls Universität, Tübingen)
  - SPSS Version 20v (SPSS Inc., Stanford, USA)
- Geldokumentationseinheit BioDoc Analyze Ti5 (Biometra, Göttingen)
- Gelkammer und PowerPac HC<sup>TM</sup> (Bio-Rad, München)
- Gießformen Disposable Plug Mold (Bio-Rad, München)
- Heizblock (Haep Labor Consult, Bovenden)
- Kühlschränke (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Premium nofrost Kühl- und Gefrierkombination (Liebherr, Biberach)

## *Material und Methoden*

- Magnetrührer mit Heizelement (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Mikrowelle MW20W TechnoStar (MST GmbH, Ingolstadt)
- Mini Vortexer (VWR International GmbH, Darmstadt)
- MyCycler™ thermal cycler (Bio-Rad, München)
- Pipetten 0,1-1 µl, 10-100 µl & 100-1000 µl Research & Reference (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Schüttler IKA-VIBRAX-VXR + Aufsatz Typ VX8 (Janke & Kunkel, Staufen)
- Timer (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Thermodrucker Seiko Precision DVP-1200 (Seiko Precision Inc., Japan)
- Zentrifuge Biofuge Fresco (Heraeus GmbH, Hanau)

### **3.1.2 Verbrauchsmaterial**

- Bechergläser 25 ml, 50 ml, 100 ml und 200 ml (Schott Duran, Mainz)
- Kryoröhrchen (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld)
- Deckelstreifen 8er, gewölbter Deckel, Perfect Seal (Star Lab, Ahrensburg)
- Einmalhandschuhe Purple Nitrile (Kimberly-Clark, Mainz)
- Einmaltupfer (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Erlenmeyerkolben 25 ml, 50 ml und 100 ml (Schott Duran, Mainz)
- Falcons 15 ml (StarLab, Ahrensburg, Germany)
- Glasflaschen 100 ml & 1 l (Schott Duran, Mainz)
- Impfösen, steril 10 µl (greiner bio one, Frickenhausen)
- Kunststoff-Falcon 15 ml (VWR International GmbH, Darmstadt & StarLab, Ahrensburg)
- Kunststoff-Petrischale (sarstedt, Nümbrecht)
- Magnetrührfische (VWR International GmbH, Darmstadt)
- MRSA CHROMagar (MAST Diagnostica, Reinfeld)
- Messzylinder 100 ml Glas (BRAND GmbH, Wertheim)
- Messzylinder 1000 ml Kunststoff (Hirschmann®, Eberstadt)
- Müller-Hinton II Agarplatte (BD, Heidelberg)
- PCR-Platte 0,2 ml, 96-Kavitäten, Non-Skirted (Star Lab, Ahrensburg)
- PCR-Platten-Verschleißmatte für 96-Kavitäten (Star Lab, Ahrensburg)
- Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl (StarLab, Ahrensburg)
- Pipettenspitzen 1000 µl (Eppendorf GmbH, Hamburg)



## *Material und Methoden*

- Reagenzglasständer (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml (StarLab, Ahrensburg)
- Reaktionsgefäßständer (BRAND GmbH, Wertheim & Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Skalpell (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Vernichtungsbeutel PP 300 x 200 mm (VWR International GmbH, Darmstadt)

### **3.1.3 Chemikalien**

- Agarose:
  - Gold Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf)
  - NEEO Ultra-Qualität (Roth, Karlsruhe)
  - SeaKem<sup>®</sup>GTG<sup>®</sup> Agarose (Lonza, Köln)
- Aqua-Bidest aus eigener Herstellung
- Brij<sup>®</sup> 58 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)
- Cefoxitin [74] 30 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- Clindamycin (CL) 2 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- EDTA (Ethylendiamintetraacetat) 0,5 M pH 8 (AppliChem, Darmstadt)
- Erythromycin (E) 15 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- Ethidiumbromid-Lösung 1 % [10 mg/ml] (Roth, Karlsruhe)
- EXO I (Exonuclease I) 20000 u/ml (New England BioLabs, Ipswich)
- Fusidinsäure (FA) 10 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- GeneRuler 50 bp (base pair, Basenpaar) DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Gentamicin 10 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- GoTaq<sup>®</sup> PCR Core System I (Promega, Mannheim)
- HPLC (high-performance-liquid-chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie)  
gereinigtes Wasser (J.T. Baker, Griesheim)
- InstaGene<sup>™</sup> Matrix (Bio-Rad, München)
- Levofloxacin (LVX) 5 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- Linezolid (LZD) 10 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- Lysostaphin 15 mg (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)
- Molecular Probes<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain 10,000X (Invitrogen<sup>™</sup>, Darmstadt)
- Natriumacetat 3 M (AppliChem, Darmstadt)

## Material und Methoden

- Natriumchlorid 0,9 % (Roth, Karlsruhe)
- Na-Desoxycholate (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)
- N-Lauryl-Sarcosine (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)
- Penicillin (P) 1 IE (internationale Einheit) Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- Proteinase K 20 mg/ml (Merck, Darmstadt)
- PVL-Vorwärts- und -Rückwärtsprimer (Microsynth, Balgach)
- Restriktionsenzym: SmaI (10 u/µl) (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Rifampin (RA) 5 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- Salzsäure 1 M (AppliChem, Darmstadt)
- SAP (shrimp alkaline phosphatase, alkalische Krabben-Phosphatase) 1 u/µl (Promega, Madison)
- spa-Vorwärts- und -Rückwärtsprimer (biomers.net, Ulm)
- TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) 10X (AppliChem, Darmstadt)
- TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) 5X (AppliChem, Darmstadt)
- Teicoplanin (TEC) 30 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- TEN-Puffer (Tris-EDTA-Natriumchlorid-Puffer) (AppliChem, Darmstadt)
- TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) pH 8 100X (AppliChem, Darmstadt)
- Tetracyclin (TE) 30 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT) 1,25 µg + 23,75 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- Tris-HCl (Tris-Hydrochlorid) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)
- Vancomycin (VA) 30 µg Testplättchen Sensi Disc (BD GmbH, Heidelberg)
- Y+/Tango-Puffer<sup>TM</sup> mit BSA 10X (Fermentas, St. Leon-Rot)

### 3.1.4 Gele, Puffer und Lösungen

#### **Agarosegele:**

##### großes PFGE-Agarosegel (1% ig):

Gold Agarose	1,6 g
0,5X TBE-Puffer	160 ml

##### kleines PFGE-Agarosegel (1% ig):

Gold Agarose	1,1 g
0,5X TBE-Puffer	110 ml

## *Material und Methoden*

### Agarosegel für Plugs (1,8%ig):

SeaKem®GTG® Agarose	0,18 g
0,5X TBE-Puffer	10 ml

### großes Agarosegel für PCR-Gelkontrollen (1,5%ig):

NEEO Ultra-Qualität	1,2 g
1X TAE-Puffer	80 ml

### kleines Agarosegel für PCR-Gelkontrollen (1,5%ig):

NEEO Ultra-Qualität	0,6 g
1X TAE-Puffer	40 ml

### **EC-Puffer pH 7,5:**

6 mM TrisHCl	0,95 g
1 M NaCl	58 g
0,5 M EDTA	10 ml
0,5 % Brij58	5 g
0,5 % N-Lauryl-Sarcosine	5 g
0,2 % Na-Desoxycholate	2 g
Aqua Bidest	ad 1 l

Anschließend den pH-Wert mit Natriumhydroxid auf 7,5 einstellen und 15 min bei 121 °C autoklavieren.

### **Ethidiumbromid-Färbelösung 1 mg/ml:**

Ethidiumbromid	50 µl
0,5X TBE-Puffer	ad 500 ml

### **Proteinase K Puffer:**

0,5 M EDTA pH 8	100 ml
1 % N-Lauryl-Sarcosine	1 g

### **SYBR® Gold Färbelösung:**

SYBR® Gold	200 µl
0,5X TBE-Puffer	200 ml

## *Material und Methoden*

### **Lysostaphin Lösung:**

Lysostaphin	10 mg
20 mM Natriumacetat	10 ml

### **1X TAE-Puffer:**

10X TAE-Puffer	100 ml
Aqua Bidest	900 ml

### **0,5X TBE-Puffer:**

5X TBE-Puffer	100 ml
Aqua Bidest	900 ml

### **1X TE-Puffer:**

100X TE-Puffer	10 ml
Aqua Bidest	990 ml

### **1X Y+/Tango-Puffer<sup>TM</sup>:**

10X Y+/Tango-Puffer <sup>TM</sup> mit BSA	1 ml
Aqua Bidest	9 ml

### 3.1.5 Nährböden

#### **COL-S (Columbia sheep blood, Columbia-Schafblut) Agar with 5 % sheep blood (BD, Heidelberg)**

Herstellerangaben Zusammensetzung pro Liter destilliertes Wasser:

pankreatisch abgebautes Casein	12 g
peptisch abgebautes Tiergewebe	5 g
Hefeextrakt	3 g
Rindfleischextrakt	3 g
Maisstärke	1 g
Natriumchlorid	5 g
Agar	13,5 g
defibriniertes Schafblut	5 %

---

pH 7,3 ± 0,2

#### **Columbia CNA (colistin nalidixic acid, Colistin Nalidixinsäure) Agar with 5% sheep blood, Improved II (BD, Heidelberg)**

Herstellerangaben Zusammensetzung pro Liter destilliertes Wasser:

pankreatisch abgebautes Casein	12 g
peptisch abgebautes Tiergewebe	5 g
Hefeextrakt	3 g
Rindfleischextrakt	3 g
Maisstärke	1 g
Natriumchlorid	5 g
Agar	13,5 g
Colistin	10 mg
Nalidixinsäure	5,5 mg
Aztreonam	3 mg
defibriniertes Schafblut	5 %

---

pH 7,3 ± 0,2

## Material und Methoden

### **DNase Platten (heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim)**

Herstellerangaben Zusammensetzung pro Liter destilliertes Wasser:

Tryptose	20 g
Natriumchlorid	5 g
DNA	2 g
Agar	14 g

---

pH 7,3 ± 0,2

### **MRSA CHROMagar (MAST Diagnostica, Reinfeld)**

Herstellerangaben Zusammensetzung pro Liter destilliertes Wasser:

Agar	15 g
Peptone und Hefe Extrakt	40 g
Salze	25 g
Chromogener-Mix	2,5 g

---

pH 6,9 ± 0,2

### **Müller-Hinton II Agarplatte (BD, Heidelberg)**

Herstellerangaben Zusammensetzung pro Liter destilliertes Wasser:

Rindfleischextrakt	2 g
Säurehydrolysat von Casein	17,5 g
Stärke	1,5 g
Agar	17 g

---

pH 7,3 ± 0,2

## 3.2. Methoden

### 3.2.1 Patienten- bzw. Isolatauswahl

Für die Auswahl geeigneter Isolate wurde die Stammsammlungsdatenbank des Instituts für Krankenhaushygiene wie im Folgenden beschrieben genutzt. Das Wort Screening wurde dabei für alle Einsendungen zum Nachweis von MRSA verwendet, egal ob es sich dabei um Eingangsscreenings direkt nach Aufnahme eines Patienten oder um einen Test nach längerem Krankenhausaufenthalt handelte.

## Material und Methoden

Im Zeitraum von Anfang 2004 bis Ende 2008 wurden im Rahmen des MRSA-Screenings an der UMM 2980 MRSA-positive Isolate für die Stammsammlung eingefroren. Bei diesen Isolaten handelt es sich zum einen um normale Haut-/Schleimhautabstriche, welche von der Abteilung für Krankenhaushygiene bearbeitet wurden, und zum anderen um Isolate, welche an einem Infektionsgeschehen beteiligt waren, bearbeitet von der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie. Letztere Isolate werden im Folgenden immer als Wundabstriche/-isolate bezeichnet, so dass alle Abstriche, bei denen es sich nicht um Haut-/Schleimhautabstriche aus der Abteilung für Krankenhaushygiene handelt, in diese Kategorie geordnet wurden, egal ob es sich beispielsweise um einen Nachweis aus Pus, Urin oder Blutkulturen handelte.

Von den eingefrorenen Isolaten der Stammsammlung ausgehend, wurden zunächst diejenigen Personen ausgeschlossen, von welchen sowohl ein Haut-/Schleimhautabstrich-, als auch ein Wundabstrich-Isolat vorlag. Somit ist eine Trennung in potentiell kolonisierte und infizierte Patienten möglich. Da es aus unterschiedlichsten Gründen von einer Person mehrere Stammsammlungsisolate geben kann, wurde zur Vermeidung von Mehrfachuntersuchungen ein und desselben Keims jeweils nur das Erstisolat von einer Person während aller fünf Untersuchungsjahre in die Analysen einbezogen.

Alle für diese Studie verwendeten MRSA-Isolate wurden vor der Typisierung nach den aktuellen, auf phänotypischen Charakteristika beruhenden Laborstandards überprüft. Hierfür wurden die kryokonservierten MRSA sowohl auf einer CNA-Blutagarplatte als auch auf einer MRSA CHROMagarplatte aufgetragen und mit dem Dreiösenausstrich fragmentiert. Nach einer Bebrütung bei 37 °C für 24-48 h zeigte die CHROMagarplatte ein MRSA-Wachstum durch lilafarbene Kolonien an. Die optische Sichtung der koloniebildenden Einheiten auf den Platten ergab bei einigen Stämmen Abweichungen vom normalen Phänotyp, sowie teilweise Mischkulturen. Zur Verifizierung des MRSA-Nachweises wurden die fraglichen Keime einem Test auf das Vorhandensein von DNase und Cefoxitinresistenz unterzogen.

Der DNase-Nachweis erfolgte auf einem DNA-haltigen Nährboden, auf welchem die Keime ausgestrichen wurden. Nach 24 h Bebrütung bei 37 °C wurde der Nährboden mit 1 M Salzsäure geflutet und nach 1 min abgossen. Um DNase-positive Kolonien wie MRSA zeigten sich klare Zonen des DNA-Abbaus, während der restliche Nährboden inklusive der Negativkontrolle (*S. epidermidis*) durch DNA-Ausfällungen getrübt blieb.

Die Methicillinresistenz wurde mittels der Resistenz gegen Cefoxitin bestätigt. Hierfür wurde der Keim auf einer Müller-Hinton II Agarplatte ausplattiert und mittig ein Cefoxitinplättchen (FOX 30) aufgelegt. Allgemein gilt: wächst ein Keim bis an das Plättchen heran, ist er

## Material und Methoden

resistent. Laut EUCAST (european committee on antimicrobial susceptibility testing, europäisches Komitee für antimikrobielle Resistenztests) [88] gehören alle Durchmesser  $\geq 22$  mm zu einem sensiblen und alle darunter zu einem resistenten Keim. Ein positives Ergebnis in beiden Tests zeigt einwandfrei MRSA an. Fälschlicherweise als MRSA deklarierte bzw. falsch eingefrorene Stämme konnten so erkannt und ausgeschlossen werden. Während der Kontrolle der Stammsammlungsisolate wurden zwei Fälle aufgedeckt, bei welchen zwei unterschiedliche MRSA-Stämme in einem Kryo-Röhrchen eingefroren waren. Für die betreffenden Patienten wurden in dieser Arbeit zwei Keime typisiert.

Letztendlich in die Studie einbezogen wurden 1114 MRSA von 1112 Patienten, wovon 352 Isolate aus dem KKM, sowie 762 Isolate aus der UMM stammten. Insgesamt wurden 638 Wundabstriche (58 %) und 476 Haut-/Schleimhautabstriche (43 %) untersucht, deren Verteilung auf die beiden Kliniken aus Tabelle 4 entnommen werden kann.

	Wundabstriche	Haut-/Schleimhautabstriche	Abstriche gesamt
KKM	131 Isolate	221 Isolate	352 Isolate
UMM	507 Isolate	255 Isolate	762 Isolate

**Tabelle 4** Darstellung der Anzahl untersuchter Isolate pro Klinikum.

Die Daten des KKM wurden nur zu Vergleichszwecken der vorherrschenden MRSA-Typen und zur Untersuchung der Thesen von FRÉDAY *et al.* [11], welche einen Zusammenhang zwischen epidemischen Potential und Virulenz mit der spa-Typ Repeatlänge postulierten, verwendet.

Die Summe der Daten aus UMM und KKM wurde im Folgenden dazu genutzt, um die MRSA-Situation im Raum Mainz zu charakterisieren.

Für detailliertere, zeitliche oder stationsbezogene Auswertungen (letztere erfolgte alphanummerisch kodiert) wurden nur diejenigen Isolate einbezogen, welche von Patienten der UMM stammten.

### 3.2.2 spa-Typisierung

Die spa-Typisierung erfolgt auf Basis der Sequenzierung des Protein A von *S. aureus*. Das Gen, welches für Protein A kodiert, besteht unter anderem aus der polymorphen X-Region, welche von hochkonservierten Regionen flankiert wird. Die X-Region ist gekennzeichnet



## Material und Methoden

durch eine variierende Anzahl von unterschiedlichen 24 bp Repeats. Die Vielfalt der X-Region kommt durch Duplikationen und Deletionen ganzer Repeats sowie Punktmutationen innerhalb der Repeats zustande. Das Vorhandensein der hochkonservierten flankierenden Bereiche ermöglicht erst den Einsatz von Primern und somit die Durchführung einer PCR [71]. Für die spa-Typisierung wird von den Entwicklern [89] folgendes Primerpaar empfohlen:

spa-11135f Vorwärts: 5'- TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C -3' ( $T_M = 62\text{ °C}$ )

spa-1514r Rückwärts: 5'- CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT -3' ( $T_M = 61\text{ °C}$ )

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch, dass bei einer Sequenzierung die Ergebnisse des Rückwärtsprimer keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten. Eine *in silico* Analyse mit dem Programm Oligoanalyzer 3.1 offenbarte, dass spa-1514r Haarnadelstrukturen bildet, welche sich störend auf die Amplifikation und somit Sequenzierung auswirken können. Mit dem Primerdesignprogramm Primer3Plus wurde im 3' Bereich des ursprünglichen Amplikons ein neuer Rückwärtsprimer entworfen. Obwohl nur um zwei Basen Richtung 5'-Ende verschoben, besitzt er wesentlich bessere Eigenschaften als spa-1514r. Mit dem Primerpaar:

spa-11135f Vorwärts: 5'- TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C -3' ( $T_M = 62\text{ °C}$ )

spa-r-neu Rückwärts: 5'- GTC AGC AGT AGT GCC GTT TGC -3' ( $T_M = 64\text{ °C}$ )

funktionierte die PCR stabil, lieferte ebenso große Banden in der Gelkontrolle wie die ursprünglichen Primer und die Sequenzierung ergab qualitativ hochwertigere Ergebnisse.

Die einzelnen Arbeitsschritte der spa-Typisierung sind im Folgenden dargestellt:

### DNA-Extraktion

Die MRSA-Isolate wurden auf COL-S Blutplatten bei 37 °C über Nacht kultiviert. Von der frischen Reinkultur wurden mittels einer 10 µl Impföse 2-3 Kolonien in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl HPLC gereinigtem Wasser gerührt. Die Suspension wurde ca. 5 sec gevortext und anschließend für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Dem Pellet wurden 100 µl InstaGene<sup>TM</sup> Matrix hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde kurz gevortext und dann bei 56 °C für 20 min

## Material und Methoden

inkubiert. Es folgte ein erneutes Vortexen für ca. 10 sec und eine Inkubation für 8 min bei 100 °C. Nach der Inkubation wurde wiederum für ca. 10 sec gevortext und für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abzentrifugiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in welchem die extrahierte Template-DNA bei -20 °C eingefroren und bis zur Verwendung verwahrt wurde.

### DNA Amplifikation

Die PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 15 µl pro Reaktion durchgeführt. Es wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Volumina verwendet. Für schwierige Templates, welche nach der PCR nur eine schwache oder gar keine Bande in der Gelkontrolle zeigten, erwies es sich als hilfreich, das Volumen der Template-DNA und des MgCl<sub>2</sub> zu erhöhen.

Mastermix Komponenten	Volumen	Finale Konzentration
5X Green GoTaq® Flexi Puffer	3 µl	1X
Nukleotid-Mix, je 10 mM	0,3 µl	je 200 µM
GoTaq® Polymerase, 5 u/µl	0,07 µl	0,35 u/15 µl
Vorwärtsprimer, 10 µmol	0,3 µl	0,2 µM
Rückwärtsprimer, 10 µmol	0,3 µl	0,2 µM
HPLC gereinigtes Wasser	8,23 µl	
Template-DNA	1 µl	< 0,15 µg/15 µl
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	1,8 µl	3 mM
Gesamtvolumen	15 µl	

**Tabelle 5** Komponenten-, Volumen- und Konzentrationsangaben für die Standard spa-PCR

Die 0,2 ml Reaktionsgefäße mit dem vollständigen 15 µl PCR Ansatz wurden in den Thermocycler gestellt. Die PCR erfolgte mit den folgenden Standardeinstellungen:

PCR-Schritt	Einstellungen
initiale Denaturierung	95 °C für 2 min
30 Zyklen Denaturierung	95 °C für 45 sec
30 Zyklen Anlagerung	60 °C für 45 sec
30 Zyklen Extension	72 °C für 1 min
Abschließender Extensionsschritt	72 °C für 5 min

**Tabelle 6** Einstellungen für die Standard spa-PCR.

## *Material und Methoden*

Für schwierige Templates wurden die Zeiten für Anlagerung und Extension erhöht, nach der initialen Denaturierung noch ein zweiter initialer Denaturierungsschritt bei 80 °C für 5 min eingefügt oder/und die Anzahl der Zyklen auf bis zu 40 erhöht. Außerdem wurden steigende und abnehmende Anlagerungstemperaturgradienten (0,1 °C pro Zyklus) getestet, mit Temperaturen bis maximal 62 °C.

### PCR-Kontrolle

Die Kontrolle für eine erfolgreiche PCR erfolgte mittels einer Gelelektrophorese. Für ein großes 1,5%iges Gel (20-40 Taschen) wurden 8 ml 10X TAE Puffer mit Aqua Bidest auf 80 ml aufgefüllt und mit 0,96 g NEEO Agarose in einem 200 ml Glaskolben aufgeköcht. Sobald die Agarose schlierenfrei war, wurde sie noch heiß in die Gelform gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in die Laufkammer zusammen mit 1 l 1X TAE-Laufpuffer gegeben. In die jeweils erste und letzte Geltasche wurden 3 µl Marker (GeneRuler 50 bp DNA Ladder) und in die übrigen Taschen je 4 µl PCR Produkt pipettiert. Ein Loading Dye wurde nicht benötigt, da der grüne Puffer aus dem Core System I Kit diesen schon beinhaltet.

Der Lauf erfolgte bei 140 V für 20 min. Danach wurde das Gel für 10 min im Ethidiumbromidbad (50 µl Ethidiumbromid auf 500 ml Aqua Bidest) gefärbt. Das oberflächlich anhaftende Ethidiumbromid wurde mit altem Laufpuffer abgespült und das Gel anschließend unter UV-Licht fotografiert. Anhand der Laufhöhe der Banden im Vergleich zum Marker konnte festgestellt werden, ob das PCR Produkt die richtige Größe von ca. 350 bp aufwies, bzw. ob es überhaupt vorhanden war.

### Aufreinigung des PCR-Produkts

Die Aufreinigung des PCR- Produkts erfolgte enzymatisch. Für 10-15 µl PCR-Produkt wurden je 0,5 µl EXO I und SAP hinzu pipettiert. Der Cyclyer wurde wie folgt programmiert:

Aufreinigung:	37 °C für 30 min
Deaktivierung der Enzyme:	80 °C für 15 min

Nach Beendigung des Programms wurden die Proben nach Berlin zur Sequenzierfirma AGOWA Genomics geschickt, welche die fertigen Sequenz-Chromatogramme zum Download im Kundenkontobereich zur Verfügung stellte.

### Auswertung der Sequenz-Chromatogramme

Die Chromatogramme aller untersuchten MRSA wurden mittels der Ridom StaphType Software analysiert. Das Programm ermittelte die spezifische Repeatabfolge eines jeden Isolates und bestimmte daraus den jeweiligen spa-Typ. Unbekannte Repeats oder spa-Typen wurden an den Ridom spa-Server übermittelt und benannt.

Die phylogenetische Auswertung erfolgte repeatbasiert per BURP-Algorithmus, welcher die Repeats aller spa-Typen der lokalen Datenbank untereinander vergleicht und verwandtschaftliche Zusammenhänge anhand von spa-Polymorphismen darstellt [70]. Die empfohlenen und voreingestellten Parameter schließen spa-Typen mit weniger als fünf Repeats aus und clustern spa-Typen zusammen, deren Kosten weniger oder gleich vier betragen. Der Kostenfaktor wurde beibehalten, aber alle spa-Typen, egal welcher Repeatlänge, wurden in die Auswertung einbezogen.

### **3.2.3 PFGE-Typisierung**

Das ursprünglich im Labor der UMM verwendete Protokoll für die MRSA-PFGE nimmt fast eine ganze Woche Arbeitszeit in Anspruch bis ein auswertbares Gel-Foto vorliegt. Aufgrund des enormen Probenumfangs wurde im Rahmen dieser Arbeit das vorliegende Haus-PFGE-Protokoll unter Orientierung an der verbesserten PFGE-Methodik von GOERING & WINTERS [75] modifiziert und konnte somit auf zwei Arbeitstage verkürzt werden. Die Arbeitsschritte der in der vorliegenden Arbeit angewandten MRSA-PFGE sind wie folgt:

#### Plug Herstellung

Die MRSA-Isolate wurden auf COL-S Blutplatten bei 37 °C über Nacht kultiviert. Von der frischen Reinkultur wurden mittels einer 10 µl Impföse 2-3 Kolonien in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml TEN-Puffer gerührt. Anschließend wurde gründlich gevortext und für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Waschprozedur mit 1ml TEN-Puffer wiederholt. Das Pellet sollte letztendlich etwas mehr als stecknadelkopfgroß sein, bevor es in 110 µl EC-Puffer durch Vortexen gelöst wurde.

Das 1,8%ige Agarosegel für die Plugs wurde kurz vor der Verwendung mit 0,18 g GTG<sup>®</sup> Agarose und 10 ml 0,5X TBE-Puffer im 25 ml Glaskolben angesetzt und bis zur Verarbeitung (zu je 2 ml Aliquots) im Heizblock bei 56 °C gelagert.

## Material und Methoden

Die Reaktionsgefäße mit dem Pellet + 110 µl EC-Puffer wurden im Heizblock bei 56 °C vorgewärmt und nach ca. 1 min mit 130 µl Agarose und 20 µl Lysostaphin versetzt. Die Mischung wurde kurz gevortext und mit einer 100 µl Pipette luftblasenfrei auf zwei Plugformen verteilt.

### Zellwandlyse und Proteinverdau

Die zwei Plugs pro Probe wurden in einem Reaktionsgefäß für 2 h im Brutschrank bei 37 °C in 1,5 ml EC-Puffer lysiert. Anschließend wurde der EC-Puffer durch 500 µl Proteinase K-Puffer + 20 µl Proteinase K ersetzt und die Plugs bei 55 °C für 90 min inkubiert. Nach dem Proteinverdau wurde der Proteinase K-haltige Puffer abpipettiert, die Plugs mit 2 ml Aqua Bidest gespült und im Anschluss in 15 ml Falcons mit ca. 5 ml TE-Puffer transferiert und für 20 min auf dem Schüttler gewaschen. Abschließend wurden die Plugs auf einer Petrischale mit einem Skalpell an der langen Seite halbiert und bis zur Weiterverarbeitung in neue 2 ml Reaktionsgefäße mit 1 ml TE-Puffer überführt.

### Restriktionsenzymverdau

Jeweils eins der vier halben Plugs pro Probe wurde für 15 min in 50 µl 1X Y+/Tango-Puffer<sup>TM</sup> vorinkubiert. Der Puffer wurde anschließend durch 100 µl 1X Y+/Tango-Puffer<sup>TM</sup> + 1 µl SmaI ersetzt. Der Restriktionsenzymverdau erfolgte für 1 h bei 30 °C im Heizblock, danach wurde der SmaI haltige Puffer entfernt und durch 1 ml 0,5X TBE-Puffer ersetzt.

### Pulsfeld-Gelelektrophorese

Für ein großes 1%iges Gel mit 30 Taschen wurde 1,6 g Gold Agarose mit 160 ml 0,5X TBE-Puffer schlierenfrei aufgekocht. Die noch heiße Agarose wurde in die Gelform gegossen, die Luftblasen entfernt und zur Reduktion von Staubpartikeln wurde das Gel zum Aushärten in den Kühlschrank gestellt, denn Staub fluoresziert nach dem Färben und stört die Auswertung. Nach der Fertigstellung wurde das Gel mit 0,5X TBE-Puffer bedeckt. In die mit Puffer gefüllten Taschen wurden mit Hilfe einer Impföse die Plugs manövriert. Dabei kam jeweils ein NCTC 8325 Plug als Größenmarker in die erste, mittlere und letzte Tasche. NCTC 8325 ist ein *S. aureus* Stamm, welcher aufgrund seines spezifischen Schnittmusters (zwischen 3-674 kb) als Größenmarker zur Gelnormierung verwendet wird [90].

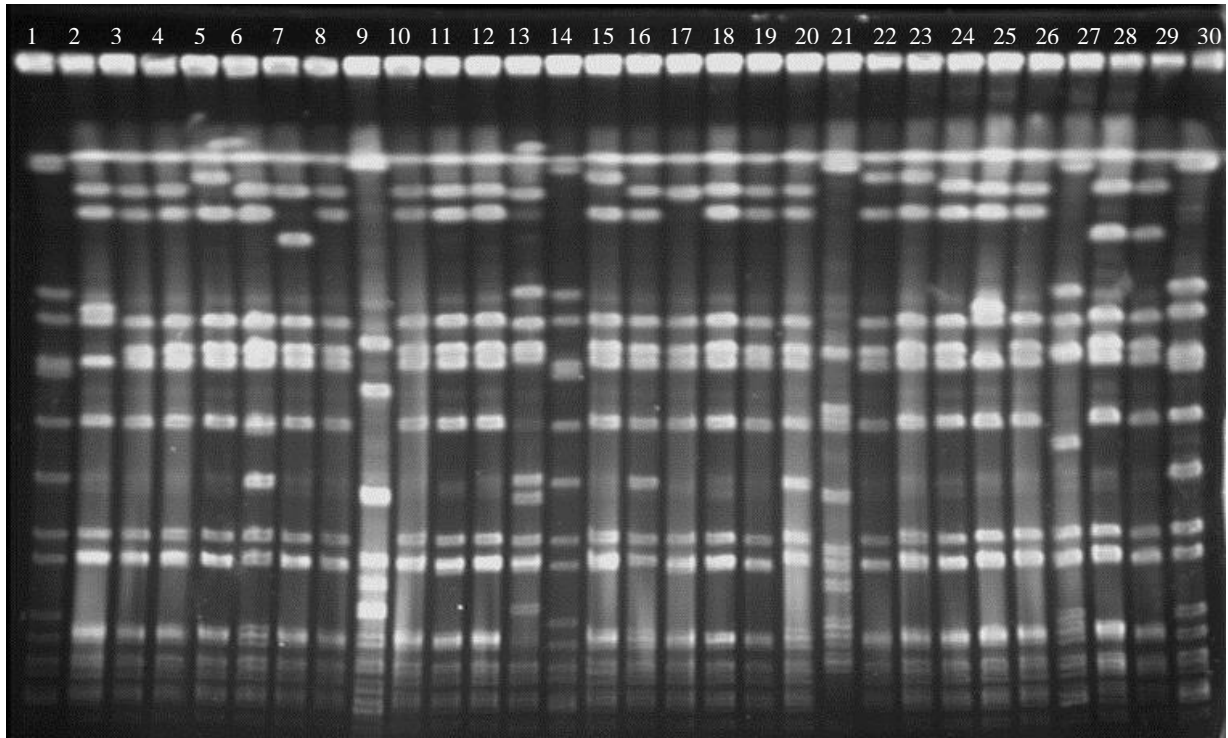
Nach der Bestückung der Taschen wurde der Puffer vom Gel abgegossen und die Taschen mit Agarose verschlossen. Das fertige Gel wurde nun in die vorgesehene Halterung in der

## Material und Methoden

Elektrophoresekammer gelegt, welche mit 2 l 0,5X TBE-Puffer gefüllt wurde. Vor Beginn des Laufs wurde der Puffer auf 13 °C abgekühlt. Die verwendeten Laufeinstellungen waren wie folgt:

Block I:	Switchzeit 5-35 sec für 20,7 h
Spannung:	6 V/cm
Bepulsungswinkel:	120 °
Umwälzrate der Pumpe:	80 %
Kühltemperatur:	13 °C

Nach 20,7 h war der Lauf beendet und das Gel wurde mit SYBR<sup>®</sup> Gold angefärbt. Da SYBR<sup>®</sup> Gold UV-beständiger als Ethidiumbromid ist und wesentlich besser an DNA bindet als herkömmliche Färbemittel [91], ist es für die Detektion der Schnittmuster eines PFGE Bildes bedeutend besser geeignet. Mit SYBR<sup>®</sup> Gold gefärbte Gele müssen nicht entfärbt werden und können sofort unter UV Licht fotografiert werden. Ein Beispiel für ein derartiges MRSA-PFGE-Bild ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4** Beispielhafte Darstellung eines PFGE-Gel-Bildes mit 27 untersuchten MRSA-Isolaten (Laufnummern 2-13 & 15-29). Die Laufnummern sind von oben nach unten, der Größenmarker NCTC 8325 befindet sich in den Laufnummern 1, 14 und 30.

Auswertung des PFGE-Bildes

Das als JPG gespeicherte Gelbild wurde mittels der Analysesoftware GelCompar® II, Version 4.5 nach den Herstellerangaben [92] ausgewertet. Zuerst wurde die JPG-Datei in das Programm geladen, die Umrisse des zu analysierenden Bereiches ausgewählt, die Laufspuren markiert und optimale Bedingungen bezüglich Hintergrundrauschen und Kontrast eingestellt. Die Banden wurden markiert und anhand des mitgelaufenen Markers NCTC 8325 normiert, die Laufspuren mit den Isolatnummern verknüpft und anschließend die Verwandtschaftsanalyse durchgeführt. Laut GelCompar® II Gebrauchsanweisung [92] eignet sich zur Analyse der Restriktionsmuster besonders die Erstellung eines Dendrogramms mit den Einstellungen: Dendrogrammtyp UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic mean, ungewichtete Gruppierungsmethode anhand arithmetischer Mittelwerte) und dem Dice-Koeffizient. Die UPGMA Cluster Methode basiert auf der Molekularen Uhr, bei der angenommen wird, dass alle Taxa sich mit derselben konstanten Rate entwickeln, basierend auf Veränderungen im genetischen Code [93]. Der Dice-Koeffizient vergleicht Ähnlichkeiten [94], in diesem speziellen Fall die Banden von Schnittmustern. Das derart gebildete Baumdiagramm stellt die Verwandtschaftsbeziehungen aller Isolate dar und wurde anhand der Empfehlungen von TENOVER *et al.* [78] ausgewertet. Mittels der in Tabelle 7 aufgeführten Interpretationskriterien wurde die Trennung zwischen nicht verwandten und verwandten Isolaten vollzogen.

Kategorie	Zahl genetischer Unterschiede*	Zahl der Fragmentunterschiede*	epidemiologische Interpretation
gleich	0	0	Teil des Ausbruchs
nahe verwandt	1	2-3	wahrscheinlich Teil des Ausbruchs
möglicherweise verwandt	2	4-6	eventuell Teil des Ausbruchs
unterschiedlich	≥ 3	≥7	nicht Teil des Ausbruchs

**Tabelle 7** Kriterien für die Interpretation von PFGE-Mustern abgewandelt nach TENOVER *et al.* [78] (\*verglichen mit dem Ausbruchstamm).

Die möglichen genetischen Events und ihre jeweiligen Auswirkungen auf das Bandenmuster werden von TENOVER *et al.* [78] wie folgt beschrieben:

- Eine Punktmutation kann zu einer neuen Schnittstelle für das Restriktionsenzym und somit zum Verlust einer Bande und dem Auftauchen von zwei neuen kleineren Banden führen. Möglich ist allerdings auch der Verlust einer Schnittstelle mit dem Resultat einer großen neuen Bande und dem Verlust von zwei kleineren. In beiden Fällen entsteht ein Unterschied von drei Banden im Vergleich zum Ausgangsstamm.
- Eine Insertion in ein existierendes Restriktionsfragment führt zur Verschiebung einer Bande nach oben, da das betreffende Fragment größer und somit schwerer geworden ist. Der Unterschied zum Ausgangsstamm beträgt zwei Banden.
- Eine Deletion aus einem existierenden Restriktionsfragment führt zur Verschiebung einer Bande nach unten, da das betreffende Fragment kleiner und leichter geworden ist. Es liegen zwei Banden Unterschied gegenüber dem Ausgangsstamm vor.

### 3.2.4 PVL-Gen-Detektion

Um zu prüfen, wie hoch der Anteil PVL-positiver MRSA an der UMM ist und ob es sich bei den Stämmen eventuell um caMRSA handelt, wurden alle 762 Isolate der UMM auf das Vorhandensein dieses Gens getestet.

Für diese Untersuchung wurde die eingefrorene, extrahierte DNA, welche schon für die spa-Typisierung hergestellt wurde, genutzt. Die verwendeten Volumina pro PCR-Ansatz wurden wie schon in Tabelle 5 beschrieben verwendet, nur dass anstelle der spa-Primer die PVL-Primer eingesetzt wurden. Diese Primer wurden eigens für die PVL-Gen-Detektion entwickelt, da die in der Literatur häufig verwendeten Primer Luk-PV-1 und Luk-PV-2 [95] trotz Anpassung der Annealingtemperatur von 55 °C auf 64 °C teilweise unspezifische Bindungen aufwiesen. Eine *in silico* Analyse mit dem Oligoanalyzer 3.1 zeigte, dass dieses Primerpaar verstärkt zur Bildung von Heterodimeren neigt. Zudem weist der Vorwärtsprimer eine Tendenz zur Ausprägung von Sekundärstrukturen auf. Eine Analyse der Zielsequenzbereiche mit Primer3Plus ergab folgendes Primerpaar als geeigneter:



## Material und Methoden

PVL Vorwärts: 5'- GCC AGA CAA TGA ATT ACC CCC ATT AGT AC -3'

( $T_M = 67,6 \text{ }^\circ\text{C}$ )

PVL Rückwärts: 5'- AGC AAA AGC AAT GCA ATT GAT GTA ACT TCT -3'

( $T_M = 68,1 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Tabelle 8 zeigt die verwendeten Standardeinstellungen für die PVL-PCR:

PCR-Schritt	Einstellungen
initiale Denaturierung	95 °C für 2 min
40 Zyklen Denaturierung	95 °C für 45 sec
40 Zyklen Anlagerung	65 °C für 45 sec
40 Zyklen Extension	72 °C für 1 min
Abschließender Extensionsschritt	72 °C für 5 min

**Tabelle 8** Einstellungen für die PVL-PCR.

Dass die PCR-Bedingungen einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis der PVL-Gen-Bestimmung haben, belegten KARAHAN *et al.* [96] mit einer Untersuchung unterschiedlicher PVL-Primerpaare und verschiedenen Annealingtemperaturen. Es ergaben sich sowohl falsch-positive, als auch falsch-negative Resultate. Um sicher zu gehen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belastbar sind, wurde die PVL-PCR sowohl mit den postulierten Primern von LINA *et al.* [95], als auch mit den neu entworfenen Primern durchgeführt. Es wurden nur Isolate als PVL-positiv gekennzeichnet, welche für beide Primerpaare positiv getestet, und in einer zusätzlichen Kontrolle vom Institut für Medizinische Mikrobiologie bestätigt wurden.

### 3.2.5 Resistenztest

Alle PVL-positiven MRSA wurden einer Resistenztestung unterzogen. Dafür wurde je eine Kolonie pro Stamm in 2 ml NaCl gerührt und gevortext. Der McFarland-Wert für die Trübung betrug ca. 0,5. Anschließend wurden pro Keim je zwei Platten Müller-Hinton II mit einem in der Keimlösung getränkten Wattetupfer netzartig ausgestrichen. Die Antibiotikatestplättchen für den Resistenztest wurden mit Antibiotikastempeln aufgebracht. Die Auswertung erfolgte, nach den aktuellen EUCAST Standards für *Staphylococcus aureus* [88]. Die folgenden Antibiotika wurden verwendet, wobei die in Klammern angegebenen Grenzwerte für R = resistent und S = sensibel dem EUCAST Standard entnommen wurden:

## *Material und Methoden*

Penicillin 1 IE (< 26 R, ≥ 26 S)

Erythromycin 15 µg (< 18 R, ≥ 21 S)

Clindamycin 2 µg (< 19 R, ≥ 22 S)

Levofloxacin 5 µg (< 19 R, ≥ 22 S)

Cefoxitin 30 µg (< 22 R, ≥ 22 S)

Gentamicin 10 µg (< 18 R, ≥ 18 S)

Trimethoprim-Sulfamethoxazol 1,25 µg + 23,75 µg (< 14 R, ≥ 17 S)

Rifampin 5 µg (< 23 R, ≥ 26 S)

Tetracyclin 30 µg (< 19 R, ≥ 22 S)

Teicoplanin 30 µg (≤ 10 R, ≥ 14 S)

Linezolid 10 µg (< 19 R, ≥ 19 S)

Vancomycin 30 µg (≤ 14 R, ≥ 15 S)

Fusidinsäure 10 µg (< 24 R, ≥ 24 S)

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Molekularbiologische Untersuchungen der MRSA-Isolate**

Die Epidemiologie ist eine sehr breitgefächerte Wissenschaft, welche die Ursachen und Entwicklungen von Krankheitsgeschehen in Populationen untersucht und in unterschiedlichsten wissenschaftlichen Bereichen (Medizin, Anthropologie, Soziologie etc.) Anwendung findet. Ein spezieller Forschungszweig ist die molekulare Epidemiologie von nosokomialen Infektionserregern wie beispielsweise MRSA. Thematisiert werden Verbreitung und Entwicklung bestimmter Typen bzw. von MRSA mit besonderen genetischen Ausstattung wie z. B. dem PVL-Gen. Um einen umfassenden Überblick über die vorherrschenden MRSA-Typen im Raum Mainz zu erhalten, wurden in dieser Dissertation über einen Untersuchungszeitraum von fünf Jahren ausgewählte MRSA-Patientenisolate typisiert und charakterisiert. Detailliertere, da klinikbezogene Untersuchungen fanden nur für die UMM statt.

#### **4.1.1 spa-Typisierung**

Da aus vielen Literaturquellen hervorgeht, dass MRSA-spa-Typen regions- oder sogar klinikspezifisch auftreten [7; 97], besteht in einem Vergleich der vorkommenden spa-Typen an den zwei großen Kliniken des Mainzer Raums (UMM und KKM) erstmals die Möglichkeit zu untersuchen, ob in Mainz regionspezifische Klone auftreten und falls ja, ob es Unterschiede in den Krankenhäusern innerhalb der Stadt gibt.

##### **4.1.1.1 Verteilung und Vorkommen von spa-Typen**

Die Untersuchung der 1114 Isolate aus dem Mainzer Raum ergab insgesamt 64 verschiedene spa-Typen, wovon 49 an der UMM und 31 am KKM gefunden wurden. Eine detaillierte Übersicht aller spa-Typen an beiden Kliniken, samt Isolatanzahlen und prozentualen Anteilen ist in Tabelle A 2. aufgeführt. Aus dieser Tabelle geht hervor, dass sowohl an der UMM (55 %) als auch am KKM (65 %) mehr als die Hälfte aller vorkommenden spa-Typen nur einmal und somit sporadisch nachgewiesen werden konnte. Lediglich acht spa-Typen an der UMM und sechs am KKM traten häufiger auf (Vorkommen  $\geq 1$  % an einer der beiden Kliniken). Eine

## Ergebnisse

Zusammenfassung zur Verteilung dieser spa-Typen ist in Tabelle 9 gegeben. Es wird ersichtlich, dass t024 am KKM etwas weniger häufig detektiert werden konnte, als an der UMM und das t1018 nur an der UMM nachgewiesen werden konnte. Alle übrigen fünf häufiger auftretenden spa-Typen wiesen an beiden Kliniken ähnliche prozentuale Vorkommen auf, inklusive der Übereinstimmung des mit über 70 % dominierenden spa-Typs t003.

spa-Typ	% UMM		% KKM	
	Anzahl	% von 762	Anzahl	% von 352
t002	15	1,97 %	5	1,42 %
t003	565	74,15 %	275	78,13 %
t008	17	2,23 %	6	1,70 %
t014	11	1,44 %	6	1,70 %
t024	8	1,05 %	1	0,28 %
t032	32	4,20 %	21	5,97 %
t045	13	1,71 %	6	1,70 %
t1018	16	2,10 %	0	0,00 %

**Tabelle 9** Vergleich der spa-Typen  $\geq 1$  % der Isolate der Gesamtuntersuchungsmenge und deren Verteilung auf UMM und KKM.

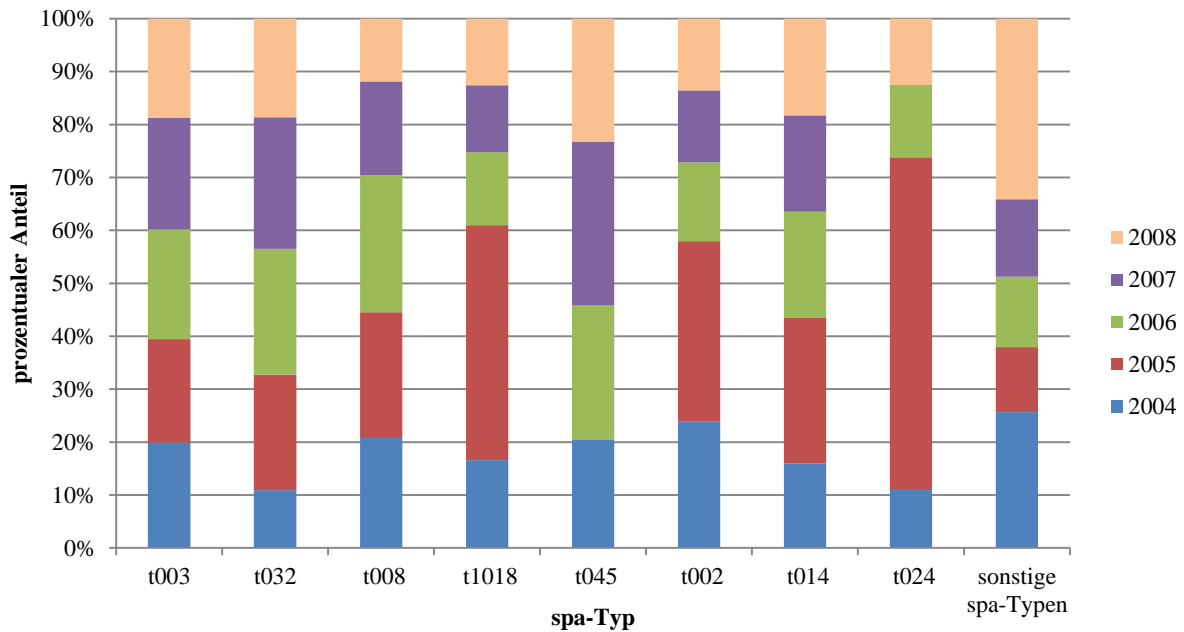
Da die meisten nachgewiesenen spa-Typen nur einmal bzw. wenige Male vorkamen, stellt sich die Frage nach der Verweildauer bzw. dem zeitlichen Auftreten der häufiger aufgetretenen Typen. Es sollte untersucht werden, ob spa-Typen ab 1 % prozentuaalem Vorkommen in der Gesamtuntersuchungsmenge in allen fünf Untersuchungsjahren persistierten oder ob es sich um ein kurzzeitiges intensives Auftreten handelte. Um die zeitliche Verteilung an einem Klinikum aufzuzeigen, wurden exemplarisch die Daten der UMM ausgewertet. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, konnten sechs von acht häufig aufgetretenen spa-Typen durchgängig in allen Untersuchungsjahren nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme bildeten t045 und t024, ersterer war 2005 nicht nachweisbar und letzterer nicht im Jahr 2007.

spa-Typ	Anzahl Isolate	2004	2005	2006	2007	2008
t002	15	+	+	+	+	+
t003	565	+	+	+	+	+
t008	17	+	+	+	+	+
t014	11	+	+	+	+	+
t024	8	+	+	+		+
t032	32	+	+	+	+	+
t045	13	+		+	+	+
t1018	16	+	+	+	+	+

**Tabelle 10** Darstellung des zeitlichen Auftretens der acht spa-Typen  $\geq 1\%$  der Gesamtuntersuchungsmenge zwischen 2004-2008 an der UMM (+ = MRSA dieser Gruppe wurden in dem jeweiligen Jahr isoliert, rote Felder markieren ein Fehlen dieser Gruppe in dem jeweiligen Jahr).

Da neben dem jährlichen Vorkommen vor allem die Frequenz Rückschlüsse auf Stabilität und positive bzw. negative Veränderungen im Keimgefüge geben kann, wurden die Schwankungen im jährlichen Auftreten der acht häufigsten spa-Typen an der UMM untersucht. Alle übrigen an der UMM nachweisbaren spa-Typen wurden unter „sonstige spa-Typen“ zusammengefasst und ebenfalls analysiert. Zunächst wurde der prozentuale Anteil eines jeden spa-Typs pro Jahr berechnet und aus diesen Daten ein Diagramm erstellt, welches die Schwankungen innerhalb der fünf Untersuchungsjahre pro spa-Typ veranschaulicht. Für eine übersichtlichere Darstellung wurde eine 100 % Skala verwendet (siehe Abbildung 5). Es konnten unterschiedliche Tendenzen beobachtet werden. Der spa-Typ t003 war der einzige, bei welchem ein konstant gleichmäßiges Auftreten zu verzeichnen war. Alle anderen spa-Typen zeigten teils größere jährliche Schwankungen, bis hin zu einem Jahr ohne Nachweis. Eine stetige Zu- oder Abnahme über den gesamten Untersuchungszeitraum konnte jedoch für keinen spa-Typ belegt werden. Auffällig waren plötzliche starke Zunahmen der prozentualen Anteile einzelner spa-Typen, wie z. B. im Jahr 2005 als die spa-Typen t1018, t002, t014 und t024 am häufigsten in allen Untersuchungsjahren nachgewiesen wurden.

## Ergebnisse



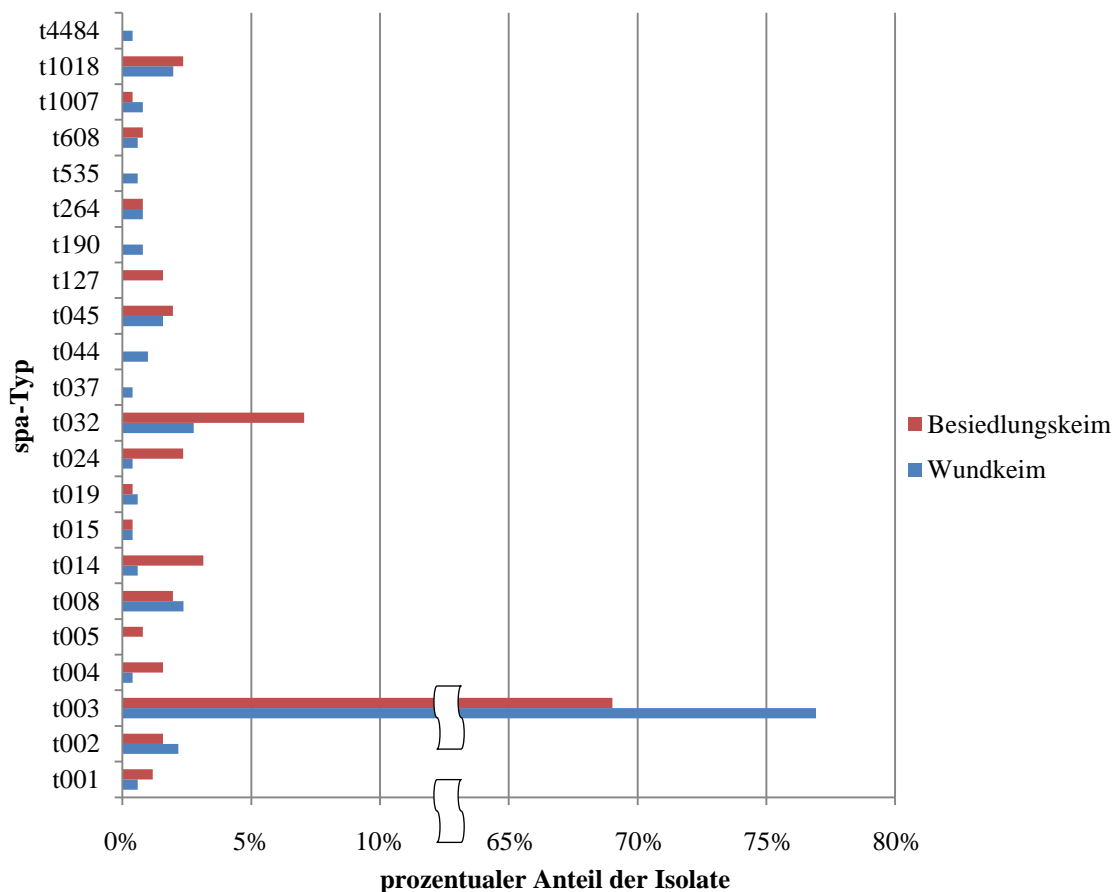
**Abbildung 5** Übersicht der jährlichen prozentualen Schwankungen der spa-Typen  $\geq 1\%$  der Gesamtuntersuchungsmenge, inklusive der Summe aller übrigen spa-Typen  $< 1\%$  (zusammengefasst unter „sonstige spa-Typen“) für den Untersuchungszeitraum 2004-2008.

Die in Abbildung 5 vorhandenen starken jährlichen Schwankungen könnten auf potentielle Ausbrüche bzw. eine gehäufte Ausbreitung auf einer bestimmten Station/in einem klinischen Bereich hinweisen. Aus diesem Grund wurden in Tabelle A 3 die einzelnen Isolate eines jeden spa-Typs nach Jahren und klinischen Bereichen geordnet. t003 wurde ausgelassen, da dieser spa-Typ mit 74 % so häufig vorkommt, dass eine derartige Auswertung nicht sinnvoll ist. Die rot unterlegten Felder in der Tabelle kennzeichnen Isolate, welche in ein und demselben klinischen Bereich, in einem engen zeitlichen Rahmen diagnostiziert wurden. Die betreffenden Isolate könnten Teil einer Übertragung, zufälligen Häufung aber auch eines Ausbruchs sein. Bei den Recherchen ergab sich, dass die zwei auffälligen Isolate des spa-Typs t008 aus dem Jahr 2006 innerhalb einer kurzen Zeitspanne im klinischen Bereich G isoliert wurden. Es stellte sich heraus, dass es sich hier um eine Übertragung des Keims während der Geburt handelte. Gleiches gilt für die vier Nachweise von t024 im Jahr 2005 welche ebenfalls im klinischen Bereich G erfolgten. Eine Mutter von Drillingen übertrug den Keim auf ihre Kinder. Der Nachweis von fünf Isolaten des spa-Typs t032 im Jahr 2007 im klinischen Bereich P2 wurde heute wie damals als kleiner Ausbruch gewertet und mit entsprechenden Hygienemaßnahmen eingedämmt. Weitere Auffälligkeiten könnten benannt werden, da diese jedoch entweder aus verschiedenen Häusern oder Stationen eines klinischen Bereichs stammten oder eine größere Zeitspanne zwischen den Detektionen lag, waren die

## Ergebnisse

möglichen Beziehungen der Patienten nicht mehr nachvollziehbar. Auch sind aus den betreffenden Bereichen keine Berichte über MRSA-Häufungen in den jeweiligen Jahren bekannt.

Neben der zeitlichen Entwicklung ist auch die Verteilung der spa-Typen auf Wund- und Haut-/Schleimhautabstriche von Interesse, denn daraus kann abgeleitet werden, ob bestimmte spa-Typen jeweils nur bzw. häufiger als Wund- oder Besiedlungskeim auftraten. Da einmalige Nachweise keine valide Auswertungsgrundlage bilden, wurden die 27 entsprechenden Gruppen ausgeschlossen. Folglich wurde die Untersuchung für 22 spa-Typen mit einer Gruppenstärke ab zwei Isolaten durchgeführt. Für jedes Isolat eines spa-Typs wurde die Zugehörigkeit als Besiedlungs- oder Wundkeim festgestellt, daraus der prozentuale Anteil eines jeden spa-Typs errechnet und in einem Diagramm aufgetragen (siehe Abbildung 6). Alle Wund- und alle Besiedlungskeime ergeben summiert jeweils 100 %, inklusive der nicht dargestellten einmaligen Nachweise.



**Abbildung 6** Prozentualer Anteil der 22 spa-Typen der UMM, welche mindestens zweimal nachgewiesen wurden. Die Summe aller Wund- und Besiedlungskeime inklusive der einmaligen Nachweise ergibt jeweils 100 %.

Aus diesem Vergleich ergab sich, dass die Mehrzahl der spa-Typen zu teilweise sehr ähnlichen prozentualen Anteilen sowohl als Wund-, als auch als Besiedlungskeim auftraten. Für einige spa-Typen gab es Ausnahmen. So wurde der spa-Typ t032 prozentual gesehen doppelt so häufig als Besiedlungs- denn als Wundkeim detektiert, t004 und t014 traten viermal häufiger und t024 sogar fünfmal häufiger als Besiedlungskeime denn als Wundkeime auf. Isolate der spa-Typen t001 und t1007 waren die einzigen, welche prozentual betrachtet doppelt so häufig als Wundkeime denn als Besiedlungskeime diagnostiziert wurden. Die Gruppengröße pro spa-Typ variierte zwischen 2-390 Isolaten, wobei die sieben spa-Typen, welche nur in einem der beiden Bereiche nachweisbar waren, aus kleinen Gruppen von zwei bis sechs Isolaten bestanden. Bei diesen spa-Typen handelte es sich um t005 und t127, welche nur in Haut-/Schleimhautabstrichen nachweisbar waren, und t037, t044, t190, t535 und t4484, welche nur in Wundabstrichen vorkamen.

### 4.1.1.2 Untersuchungen zur spa-Typ-Repeatlänge

FRÉNAVY *et al.* [11] stellten die Hypothese auf, dass die Anzahl der Repeats eines spa-Typs mit dem epidemischen Potential eines Stammes korreliert. Epidemiestämme sollen demnach mindestens eine Repeatzahl  $\geq 8$  aufweisen. Des Weiteren postulierten sie eine gesteigerte Virulenz für spa-Typen mit einer hohen Repeatzahl.

Zur Verifizierung der Thesen wurde die größtmögliche Probenmenge dieser Arbeit verwendet. Somit wurden alle 1114 untersuchten Isolate des Mainzer Raums in die Analysen einbezogen. Um die erste der beiden Thesen zu prüfen, wurde die Repeatlänge eines jeden der 64 im Mainzer Raum vorkommenden spa-Typen erfasst und die jeweiligen Stämme in eine Gruppe  $\leq 7$  und  $\geq 8$  Repeats geordnet (siehe Tabelle A 4). Von den insgesamt 64 unterschiedlichen spa-Typen, des Mainzer Raums wiesen 39 % eine X-Region  $\leq 7$  auf und 61 %  $\geq 8$ .

Zur Überprüfung der gesteigerten Virulenz von spa-Typen mit langen Repeatregionen wurden die 1114 Isolate in Wund- und Haut-/Schleimhautabstriche unterteilt. In Tabelle 11 ist dargestellt, wie viele spa-Typen jeweils eine bestimmte Zahl an Repeats aufwiesen und ob diese eher in Wunden, auf der Haut oder in beiden Lokalisationen vertreten waren. Von 48 spa-Typen aus 638 Wundabstrichen wiesen 59 % eine Repeatregion  $\geq 8$  auf und von 33 spa-Typen aus 476 Haut-/Schleimhautabstrichen waren es 73 % (siehe Tabelle 11). Eine ausführliche Unterscheidung der einzelnen spa-Typen, welche in Wundinfektionen oder als Besiedlungskeim gefunden wurden ist in Tabelle A 4 aufgeführt.



	48 spa-Typen aus 638 Wunden, davon:	33 spa-Typen aus 476 Haut-/Schleimhautabstrichen, davon:
3 Repeats	2 (4,17 %)	0 (0,00 %)
4 Repeats	2 (4,17 %)	3 (9,09 %)
5 Repeats	2 (4,17 %)	3 (9,09 %)
6 Repeats	6 (12,50 %)	0 (0,00 %)
7 Repeats	8 (16,67 %)	3 (9,09 %)
8 Repeats	4 (8,33 %)	5 (15,15 %)
9 Repeats	10 (20,83 %)	5 (15,15 %)
10 Repeats	7 (14,58 %)	8 (24,24 %)
11 Repeats	3 (6,25 %)	1 (3,03 %)
12 Repeats	1 (2,08 %)	1 (3,03 %)
13 Repeats	0 (0,00 %)	1 (3,03 %)
15 Repeats	1 (2,08 %)	1 (3,03 %)
16 Repeats	1 (2,08 %)	1 (3,03 %)
17 Repeats	1 (2,08 %)	1 (3,03 %)

**Tabelle 11** Absolute und prozentuale Verteilung der spa-Typenanzahl nach ihrer jeweiligen Repeatlänge für Wund- und Haut-/Schleimhautabstriche.

#### 4.1.1.3 spa-Clusteranalyse für die UMM mittels BURP-Algorithmus

Da schon eine Punktmutation in einem Repeat einen anderen spa-Typ bedingt, kann anhand der spa-Typenbenennung keine Aussage zur klonalen Verwandtschaft getroffen werden. Dies soll durch die Anwendung des BURP-Algorithmus möglich werden. Mittels dieser Methode wurden die 762 Isolate der UMM basierend auf der Ähnlichkeit ihrer Repeats geclustert. Zunächst wurden die Voreingestellten Parameter genutzt (Ausschluss aller spa-Typen kürzer 5 Repeats und clustern wenn die Kosten weniger oder gleich vier sind). Dabei sollten insgesamt sechs spa-Typen (12 %) von 49 ausgeschlossen werden. Davon müssten t027, t457, t463, t535 und t1007 ihrer Repeatabfolge nach zum spa-CCt003 Cluster gehören. t1028 hingegen konnte keinem Cluster zugeordnet werden und ist als unabhängig von den lokalen Clustern zu betrachten. Einsicht in die Repeatabfolgen der einzelnen spa-Typen, sowie der möglichen genetischen Events innerhalb der spa-CCs liefert Tabelle A 6.

Ein Einschluss aller spa-Typen ungeachtet der Repeatlänge, bei gleichbleibendem, voreingestelltem Kostenfaktor ergab die in Tabelle 12 aufgeführten vier Cluster und 14 unabhängigen Typen. Es bestätigte sich somit die vorherige nicht programm-basierte Zuordnung von t027, t457, t463, t535 und t1007 zum spa-CCt003 Cluster und t1028 als

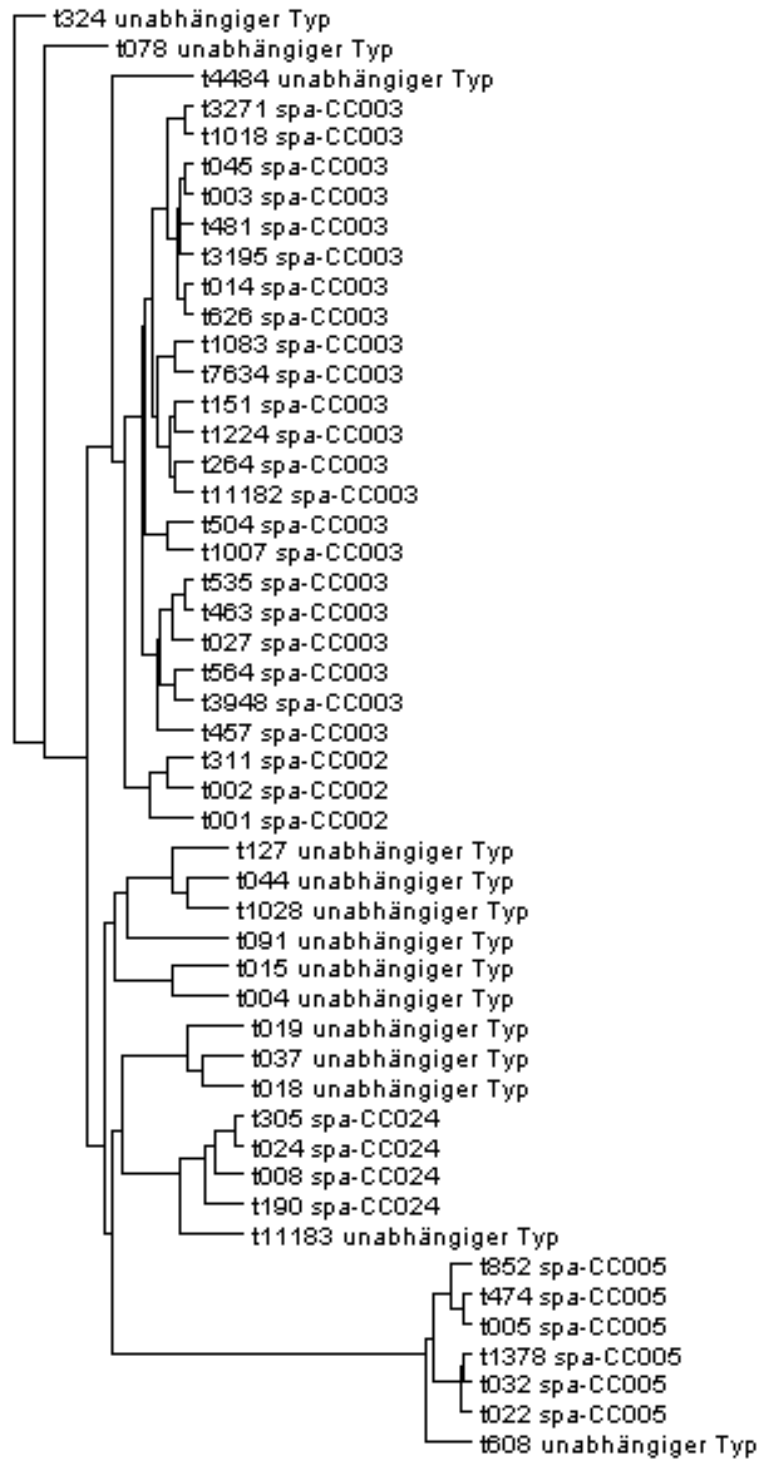
## Ergebnisse

unabhängigen Typ. Wie aus den statistischen Angaben hervor geht, war der spa-CC003 der größte aller gebildeten spa-CCs, sowohl was die Anzahl der Isolate, als auch die zugehörigen spa-Typen angeht.

spa-CC	spa-Typ	Statistik
<b>spa-CC003</b>	t003, t014, t027, t045, t151, t264, t457, t463, t481, t504, t535, t564, t626, t1007, t1018, t1083, t1224, t3195, t3271, t3948, t7634, t11182	634 (83 %) aller Isolate 22 (45 %) aller spa-Typen
<b>spa-CC005</b>	t005, t022, t032, t474, t852, t1378	38 (5 %) aller Isolate 6 (12 %) aller spa-Typen
<b>spa-CC024</b>	t008, t024, t190, t305	30 (4 %) aller Isolate 4 (8 %) aller spa-Typen
<b>spa-CC002</b>	t001, t002, t311	22 (3 %) aller Isolate 3 (6 %) aller spa-Typen
<b>unabhängige Typen</b>	t004, t015, t018, t019, t037, t044, t078, t091, t127, t324, t608, t1028, t4484, t11183	38 (5 %) aller Isolate 14 (29 %) aller spa-Typen

**Tabelle 12** Übersicht der mittels BURP-Algorithmus geclusterten spa-CCs mit Angabe aller zugehörig geclusterten spa-Typen und der jeweiligen Größe des spa-CCs betreffend Isolatanzahl und Menge der spa-Typen.

Die weiteren verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb und zwischen den spa-CCs und unabhängigen Typen konnten mittels einer Übertragung der Daten aus StaphType an das Programm Splits Tree4 errechnet werden, wobei nur ein Isolat pro spa-Typ übermittelt wurde. Splits Tree4 ist führend in der Erstellung phylogenetischer Stammbäume aus molekularen Sequenzdaten oder Kosten-/Distanzmatrizen [98]. Als Grundlage für die Berechnung wurde UPGMA ausgewählt und die Darstellung als Phylogramm (siehe Abbildung 7). Das Programm gibt jedoch keine Skala aus, so dass keine Aussagen zur tatsächlichen prozentualen Ähnlichkeit getroffen werden konnten.



**Abbildung 7** Mit Splits Tree 4 erstelltes Phylogramm der 49 spa-Typen der UMM errechnet aus der Kosten-/Distanzmatrix basierend auf der Auswertung der Repeatmuster mit StaphType. Angegeben wurde jeweils der spa-Typ inklusive von StaphType ermitteltem spa-CC.

#### 4.1.1.4 Verfahrenstestung der spa-Typisierung

Für die Verfahrenstestung wurden alle Daten des Mainzer Raumes herangezogen, da sie die größte Anzahl untersuchter Isolate aufweist und somit eventuelle Verfahrensschwächen deutlicher werden. Molekulare Typisierungsverfahren müssen nach WITTE *et al.* [99] vier festgelegte Anforderungen erfüllen, um als geeignet zu gelten:

1.) Damit eine hohe Typisierbarkeit ( $\geq 95\%$ ) gewährleistet ist, müssen die untersuchten Merkmale bei fast allen Isolaten der Erregerspezies nachgewiesen werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 1116 MRSA-Isolate spa-typisiert. Es gab lediglich zwei Fälle (0,18%), welche sich als nicht typisierbar erwiesen und die daher von der Untersuchung ausgeschlossen wurden. Die spa-Typisierung erreichte somit eine Typisierbarkeit von 99,82%.

2.) Die Typisierungsergebnisse müssen bei erneuten, unabhängigen Versuchen reproduzierbar sein.

Um diese Anforderung zu testen, wurden alle 274 Isolate, welche nicht t003 als Ergebnis hatten nach dem Ergebnis der Vorwärtssequenzierung auch rückwärts sequenziert, um das Ergebnis zu verifizieren. Außerdem wurde bei 280 t003 eine erneute Sequenzierung durchgeführt, da das Ergebnis der ersten Analyse nicht von guter Qualität war. Alle erneuten Sequenzierungen, bis auf zwei bestätigten das erste Ergebnis. Bei den zwei Proben mit abweichendem Ergebnis wurde festgestellt, dass zwei unterschiedliche Stämme in einem Kryoröhrchen eingefroren waren.

3.) Im Verlauf eines Ausbruchs sollten die Merkmale ausreichend stabil sein.

Alle 554 wiederholten Sequenzierungen verteilen sich auf 1-3 Jahre nach der Erstsequenzierung und bestätigten immer das vorausgegangene Ergebnis.

4.) Das gewählte Typisierungsverfahren sollte eine ausreichende Anzahl an unterschiedlichen Typen gewährleisten, wobei der Anteil des häufigsten Typus 5% der Gesamtisolatanzahl der getesteten Speziespopulation nicht übersteigen sollte.

Da die Daten des Mainzer Raumes zwei Kliniken beinhalten, erschien es sinnvoll diese vierte Anforderung für jede Klinik zu testen. Die spa-Typisierung resultierte für alle 1114 Isolate des Mainzer Raums in 64 unterschiedlichen spa-Typen, wovon 49 an der UMM und 31 am

## Ergebnisse

KKM nachgewiesen werden konnten. Die meisten spa-Typen wurden zwischen einem und zehn Mal nachgewiesen (siehe Tabelle 13). Lediglich zwei spa-Typen wiesen Isolatzahlen  $\geq 5\%$  der Untersuchungsmenge auf. An der UMM betraf dies t003 und am KKM zusätzlich t032.

	UMM	KKM
<b>Untersuchungsmenge</b>	762	352
<b>5 % von der Untersuchungsmenge</b>	38	18
<b>Gesamtzahl der spa-Typen</b>	<b>49 (100 %)</b>	<b>31 (100 %)</b>
<b>&lt; 10 Isolate</b>	42 (86 %)	29 (94 %)
<b>= 1 Isolat</b>	27 (55 %)	20 (65 %)
<b><math>\geq 10</math> Isolate</b>	7 (14 %)	2 (6 %)
<b><math>\geq 100</math> Isolate</b>	1 (2 %)	1 (3 %)
<b><math>\geq 5\%</math> der Untersuchungsmenge</b>	1 (2 %)	2 (6 %)

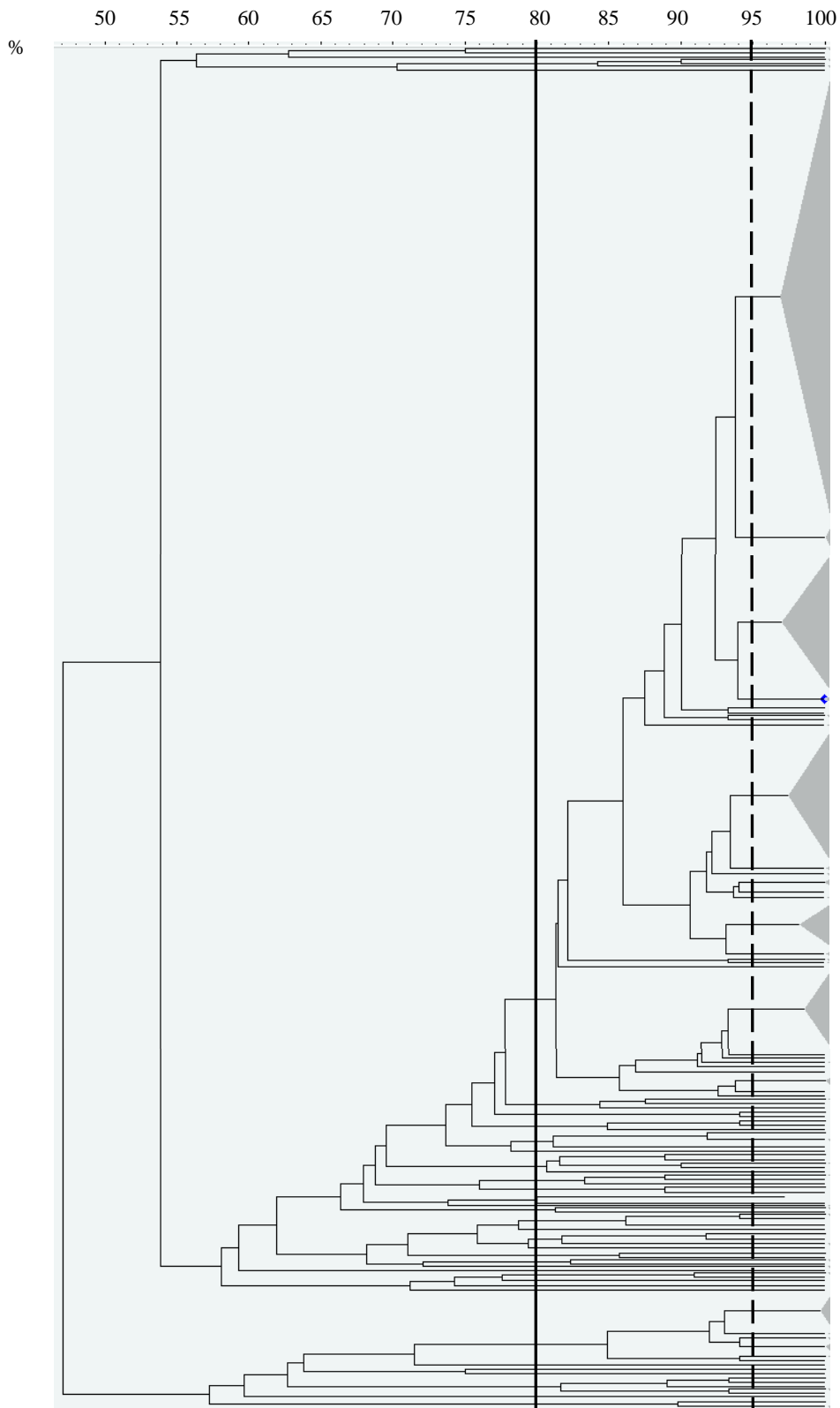
**Tabelle 13** Absolute und prozentuale Verteilung von spa-Typen, nach der Anzahl der zugehörigen Isolate, für die UMM und das KKM.

### 4.1.2 PFGE

Da die spa-Typisierung sowohl die untersuchten Isolate der UMM als auch die des KKM zu 74 bzw. 78 % dem spa-Typ t003 zuordnete (siehe Tabelle 9) und laut WITTE *et al.* [99] der häufigste Typ, welcher in einem Typisierungsverfahren vorkommt, 5 % der untersuchten Speziespopulation nicht überschreiten sollte, wurden alle Isolate noch einmal einem anderen molekularbiologischen Verfahren zur Verwandtschaftsanalyse zugeführt. Vor allem sollte dabei getestet werden, ob die t003-Isolate mittels PFGE noch einmal untergliedert werden können. Da die PFGE in der Literatur oft als Mittel der Wahl zur Detektion von Ausbrüchen beschrieben wird [72; 100; 101] und diese Methode sich nicht nur einem Gen widmet, sondern die ganze DNA mittels Restriktionsenzymen behandelt wird, wurde ein positiver Effekt erwartet.

Anhand der Schnittmuster wurde zunächst für alle 1114 untersuchten MRSA mit der Software GelComparII unter Verwendung des Diagrammtypus UPGMA und des bandenbasierten Dice-Algorithmus ein Dendrogramm erstellt (siehe Abbildung 8). Dies diente der einheitlichen und durchgängigen Gruppierung aller Isolate. Die Gruppenbenennung erfolgte der Reihe nach von oben nach unten, konnte jedoch aus platzgründen nicht in Abbildung 8 dargestellt werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 8** Dendrogramm aller 1114 mittels PFGE untersuchter MRSA des Mainzer Raums. Die durchgezogene Linie bei 80 % markiert die Grenze zwischen verwandten und nicht verwandten MRSA und bildet gleichzeitig die Grenze für PFGE-Obergruppen. Ab 95 % (gestrichelte Linie) gleichen sich die Isolate vollkommen werden daher in die selbe Untergruppe geordnet. Die Grauen Dreiecke stehen für die Zusammenfassung aller Isolate  $\geq 95$  % Ähnlichkeit und dienen der Übersichtlichkeit.

## Ergebnisse

Das Dendrogramm beinhaltet eine Prozentskala, anhand welcher intra- (PFGE-Untergruppen) und interspezifische (PFGE-Obergruppen) Gruppenunterschiede festgelegt werden konnten. Isolate mit 100 %-95 % Übereinstimmung wiesen lediglich minimale Unterschiede in der Bandenhöhe auf, bedingt durch Laufunterschiede innerhalb eines Gels oder von Gel zu Gel und waren somit als gleich anzusehen (siehe Tabelle 7).

Unter 95 % traten die ersten nicht laufbedingten Bandenunterschiede auf. Nach den Kriterien von TENOVER *et al.* [78] ist bei zwei bis sechs Bandenunterschieden von nahe bis möglicherweise verwandten Isolaten auszugehen und ab sieben Banden Unterschied von verschiedenen Keimen. Da bis zu einer Grenze von 80 % nur zwei bis sechs Bandenunterschiede auftraten, wurde die Grenze zwischen verwandt und nicht verwandt auf 80 % (durchgezogene Linie siehe Abbildung 8) festgesetzt. Dies entspricht auch der in vielen Publikationen postulierten Trennlinie zur Unterscheidung zwischen phylogenetisch verwandten und nicht verwandten PFGE-Clustern [102-105]. Somit wurden alle MRSA-Isolate mit einem Verwandtschaftsgrad unter 80 % als nicht miteinander verwandt und ab 80 % als miteinander verwandt angesehen. Die 80 % Grenze wurde gleichzeitig als Benennungsgrenze für PFGE-Obergruppen (römische Zahl) festgelegt. Eine PFGE-Obergruppe beinhaltete alle potentiell miteinander verwandten Isolate, welche ab einer Ähnlichkeit von 95-100 % (gestrichelte Linie) aufgrund ihrer übereinstimmenden Schnittmuster in einer Untergruppe (arabische Zahl) zusammengefasst wurden. Für alle 1114 MRSA aus dem Raum Mainz ergaben sich 36 Obergruppen (römischen Zahlen I-XXXVI) mit einer differierenden Anzahl an Untergruppen. Wie in Tabelle A 5 aufgezeigt, konnten insgesamt 99 unterschiedliche PFGE-Gruppen (II-XXXVI2) mit einer Stärke von 1-416 Isolaten unterschieden werden.

### 4.1.2.1 Verteilung und Vorkommen von PFGE-Gruppen

Insgesamt konnten im Mainzer Raum 99 PFGE Untergruppen nachgewiesen werden, welche jedoch nicht alle an beiden Kliniken detektiert wurden (siehe Tabelle A 5). An der UMM konnten insgesamt 85 und am KKM 49 der Untergruppen belegt werden, wovon 42 (49 %) bzw. 25 (51 %) nur einmalig dokumentiert wurden. Die größten PFGE-Gruppen, welche an UMM und/oder KKM  $\geq 1$  % der Isolate der Gesamtuntersuchungsmenge beinhalteten, waren jeweils an beiden Kliniken vorhanden (siehe Tabelle 14).

PFGE-Gruppe	UMM		KKM	
	Anzahl	% von 762	Anzahl	% von 352
<b>VI1</b>	301	39,50%	115	32,67%
<b>VI2</b>	19	2,49%	8	2,27%
<b>VI3</b>	89	11,68%	41	11,65%
<b>VI4</b>	9	1,18%	2	0,57%
<b>VI10</b>	85	11,15%	39	11,08%
<b>VI11</b>	8	1,05%	1	0,28%
<b>VI13</b>	7	0,92%	6	1,70%
<b>VI15</b>	2	0,26%	5	1,42%
<b>VI16</b>	29	3,81%	15	4,26%
<b>VI17</b>	5	0,66%	4	1,14%
<b>VI21</b>	36	4,72%	39	11,08%
<b>VI27</b>	10	1,31%	4	1,14%
<b>X2</b>	4	0,52%	4	1,14%
<b>XXX1</b>	21	2,76%	14	3,98%
<b>XXX4</b>	5	0,66%	9	2,56%

**Tabelle 14** Vergleich der PFGE-Untergruppen  $\geq 1$  % der Isolate der Gesamtuntersuchungsmenge und deren Verteilung auf UMM und KKM.

Da die Verwandtschaftsanalyse per PFGE eine höhere Differenzierbarkeit ermöglicht als die spa-Typisierung, ist das zeitliche Auftreten der größten Gruppen von besonderem Interesse, vor allem weil neun der zehn Gruppen dem spa-Typ t003 zugeordnet wurden. Wie aus Tabelle 15 ersichtlich, kamen bis auf VI4, VI11 und VI27 alle, in diesem Zusammenhang untersuchten, PFGE-Gruppen in allen Untersuchungsjahren vor. Isolate aus der Gruppe VI11 konnten jeweils 2004 und 2006 nicht nachgewiesen werden, während VI4 jeweils 2006 und VI27 im Jahr 2008 nicht nachweisbar waren. Diese Gruppen stellten zeitgleich mit neun, acht und zehn Isolaten die zahlenmäßig kleinsten der zehn größten PFGE-Gruppen der UMM dar.

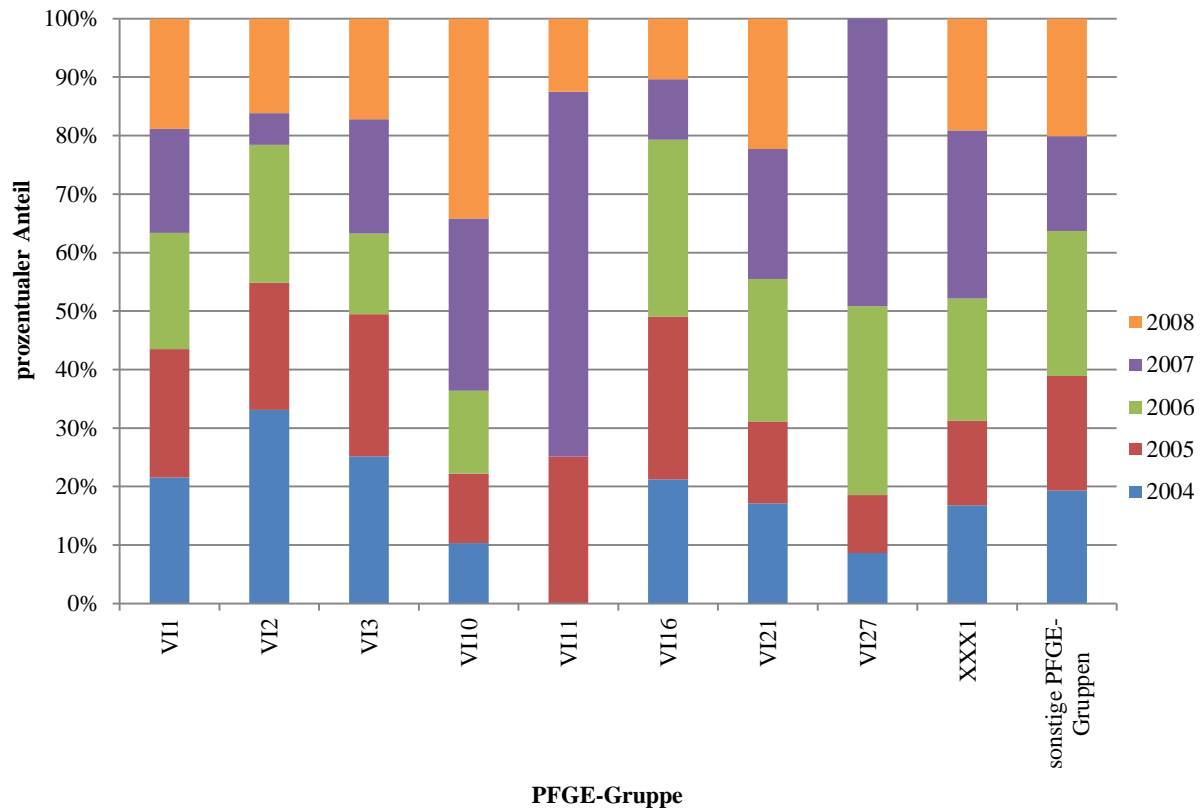


PFGE-Gruppe	Anzahl Isolate	2004	2005	2006	2007	2008
VI1	301	+	+	+	+	+
VI2	19	+	+	+	+	+
VI3	89	+	+	+	+	+
VI4	9	+	+		+	+
VI10	85	+	+	+	+	+
VI11	8		+		+	+
VI16	29	+	+	+	+	+
VI21	36	+	+	+	+	+
VI27	10	+	+	+	+	
XXX1	21	+	+	+	+	+

**Tabelle 15** Darstellung des zeitlichen Auftretens der zehn PFGE-Untergruppen  $\geq 1\%$  der Gesamtuntersuchungsmenge zwischen 2004-2008 an der UMM (+ = MRSA dieser Gruppe wurden in dem jeweiligen Jahr isoliert, rote Felder markieren ein Fehlen dieser Gruppe in dem jeweiligen Jahr).

Da neben dem jährlichen Vorkommen vor allem die Frequenz auf Veränderungen schließen lässt, wurden die Schwankungen im jährlichen Auftreten der zehn häufigsten PFGE-Gruppen an der UMM untersucht. Alle übrigen an der UMM nachweisbaren PFGE-Gruppen wurden unter „sonstige PFGE-Gruppen“ zusammengefasst und ebenfalls analysiert. Zunächst wurde der prozentuale Anteil jeder PFGE-Gruppe pro Jahr berechnet und aus diesen Daten ein Diagramm erstellt, welches die Schwankungen innerhalb der fünf Untersuchungsjahre pro PFGE-Gruppe veranschaulicht. Für eine übersichtlichere Darstellung wurde eine 100 % Skala verwendet (siehe Abbildung 9). Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass VI1 die einzige PFGE-Gruppe mit einem nahezu konstanten jährlichen Auftreten war, alle anderen Gruppen zeigten stärkere jährliche Schwankungen. Bei VI10 konnte als einziger Gruppe während des gesamten Untersuchungszeitraumes eine ständige Steigerung der Gruppengröße nachgewiesen werden. Eine Korrelation mit dem genau gegensätzlichen Verhalten anderer Gruppen könnte vermutet werden, da die Kausalitätsfrage jedoch bei einem solchen Test sehr unsicher und die Einflüsse multifaktoriell sind, wurde darauf verzichtet.

## Ergebnisse



**Abbildung 9** Übersicht über das zeitliche Auftreten und die prozentuale Verteilung der PFGE-Untergruppen an der UMM,  $\geq 1\%$  der Gesamtuntersuchungsmenge, inklusive der Summe aller übrigen Gruppen  $\leq 1\%$  (zusammengefasst in „sonstige PFGE-Gruppen“) für den Untersuchungszeitraum 2004-2008.

Ein abrupter Anstieg der Isolatzahlen eines Jahres für eine bestimmte PFGE-Gruppe könnte genau wie bei der spa-Typisierung einen Hinweis auf ein gehäuftes zufälliges Vorkommen, eine Übertragung oder auch einen Ausbruch geben. Die auffälligsten jährlichen Zunahmen waren bei VI11 und VI27 im Jahr 2007 zu verzeichnen. Aufgrund der Masse an Daten und zur Wahrung der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung in der vorliegenden Arbeit auf das Notwendigste reduziert. Daher wurden in Tabelle 16 nur die Isolate aus den Gruppen VI11 und VI27 aus dem Jahr 2007 abgebildet und als exemplarischer Ausschnitt die ersten 20 Isolate der größten Gruppe VI1 für 2007. Wie aus den Daten ablesbar, konnte für VI11 und VI27 keinerlei bereichsbezogene Häufung festgestellt werden. KH095/07 (Entnahmedatum 16.02.2007) und KH231/07 (Entnahmedatum 30.05.2007) aus dem Bereich N lagen zeitlich zu weit auseinander, als das auf einen Zusammenhang zwischen den Nachweisen geschlossen werden konnte. Die Darstellung der ersten 20 Isolate aus der Gruppe VI1 sollte verdeutlichen, welche Anhäufungen an Nachweisen eines derart häufigen Keims in einzelnen klinischen Bereichen immer wieder vorkamen. Je größer die Differenz der KH-Nummern zwischen zwei Nachweisen ist, desto größer ist im Allgemeinen auch der Abstand des zeitlichen Nachweises.

PFGE-Gruppe	2007		
	KH-Nummer	klinischer Bereich	spa-Typ
VI11	KH258/07	F	t003
	KH229/07	G	t003
	KH253/07	Q	t003
	KH605/07	Q1	t457
	KH510/07	R1	t003
VI27	KH095/07	N	t003
	KH231/07	N	t003
	KH265/07	O3	t003
	KH602/07	P	t003
	KH191/07	R1	t1007
VI1	KH097/07	P	t003
	KH125/07	P	t003
	KH139/07	P	t003
	KH379/07	P	t003
	KH140/07	P	t014
	KH190/07	Q	t003
	KH198/07I	K1	t003
	KH362/07	O3	t003
	KH466/07	O3	t003
	KH560/07	O3	t003
	KH308/07	O6	t003
	KH326/07	O6	t003
	KH467/07	O6	t003
	KH576/07	O6	t002
	KH263/07	O6	t003
	KH262/07	O7	t003
	KH316/07	O7	t003
	KH294/07	O13	t003
	KH005/07	O16	t003
	KH324/07	O16	t003

**Tabelle 16** Ausschnitt über die Verteilung auf klinische Bereiche für die PFGE-Gruppen VI11, VI27 und VI1 für das Jahr 2007.

#### 4.1.2.2 Vergleich der Ergebnisse von BURP- und PFGE-Clustering an der UMM

Für die beiden in dieser Arbeit angewendeten Typisierungsmethoden besteht die Möglichkeit einer phylogenetischen Auswertung der Ergebnisse mittels Clusteranalyse. Für die spa-Typisierung wurde eine BURP-Clustering (basierend auf einem Vergleich der Repeatsequenz unterschiedlicher spa-Typen) und für die PFGE eine Clustering basierend auf der Ähnlichkeit der Schnittmuster durchgeführt.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der beiden Clusteranalysen für alle 762 untersuchten Isolate aus der UMM ist in Tabelle A 7 aufgezeigt. Es erfolgte zunächst eine Aufteilung anhand aller einzelnen 85 PFGE-Dendrogrammgruppen, mit Angabe der jeweiligen MRSA-Isolatzahlen, welche dieses Muster aufwiesen. Für alle MRSA einer Dendrogrammgruppe wurden die vertretenen spa-Typen und deren Isolatanzahl bestimmt, sowie die spa-CCs ergänzt. Da sich 49 spa-Typen auf insgesamt 85 PFGE-Gruppen verteilten, konnte ein spa-Typ in mehreren PFGE-Gruppen vorkommen. Umgekehrt konnte eine PFGE-Gruppe jedoch auch mehrere spa-Typen aufweisen.

Da jede Änderung in der Basenabfolge eines Repeats zu einem anderen spa-Typ führt konnte mittels der Anwendung des BURP-Algorithmus, welcher Repeatabfolgen miteinander vergleicht, eine phylogenetische Aussage getroffen werden. Die derart gebildeten spa-CCs wurden mit den Gruppen der PFGE verglichen. Dabei wurde deutlich, dass es bezüglich der PFGE-Obergruppen nur Überschneidungen zwischen den spa-CCs 003 und 002 gab, welche die Obergruppen VI und XVII teilen (siehe Tabelle 17). Die von spa-CC-unabhängigen Typen wurden zumeist in eine eigene PFGE-Obergruppe geclustert, kamen jedoch auch in großen Obergruppen wie VI oder kleineren wie X oder XII vor. Auffällig war die Vielzahl unterschiedlicher PFGE-Obergruppen in den einzelnen spa-CCs.

spa-CC	PFGE-Obergruppen
spa-CC002	VI, XI, XIII, XIV, XVII
spa-CC003	III, VI, VII, VIII, X, XII, XVII, XXV
spa-CC005	XXX, XXXI
spa-CC024	XV, XVIII, XX, XXI, XXII, XXIII, XXXIII
unabhängige Typen	II, IV, V, VI, X, XII, XVI, XVII, XIX, XX, XXIII, XXIV, XXVI, XXVII, XXXII, XXXV, XXXIV, XXXVI

**Tabelle 17** Übersicht aller spa-CCs und der ermittelten PFGE-Obergruppen.

#### **4.1.2.3 Verfahrenstestung der PFGE**

Wie schon für die spa-Typisierung wurden auch für die PFGE die vier vorgeschriebenen Anforderungen an ein geeignetes Typisierungsverfahren nach WITTE *et al.* [99] geprüft. Grundlage dafür bildeten die PFGEs aller 1114 analysierten MRSA-Isolate.

1.) Die untersuchten Merkmale müssen bei fast allen Isolaten der Erregerspezies nachgewiesen werden können, damit eine hohe Typisierbarkeit gewährleistet ist. Diese sollte ca. 95 % betragen.

Von den 1114 spa-typisierten MRSA-Isolaten, welche der PFGE zugeführt wurden, ergab sich eine Typisierbarkeit von 100 %.

2.) Die Typisierungsergebnisse müssen bei erneuten, unabhängigen Versuchen reproduzierbar sein.

Diese Anforderung wurde getestet, indem Gele von geringer Qualität nach der Herstellung neuer Plugs wiederholt wurden, um zu verifizieren, dass alle Banden ordnungsgemäß erkannt wurden. Auch die erneute Testung der insgesamt 48 Einzelmuster ergab keine Änderung im Bandenprofil. Alle wiederholten Gelläufe bestätigten das erste Ergebnis.

3.) Im Verlauf eines Ausbruchs sollten die Merkmale ausreichend stabil sein.

Alle wiederholten PFGE Läufe verteilten sich auf 1-2 Jahre nach dem ersten Lauf und bestätigten immer das vorausgegangene Ergebnis.

4.) Das gewählte Typisierungsverfahren sollte eine ausreichende Anzahl an unterschiedlichen Typen gewährleisten, wobei der Anteil des häufigsten Typus 5 % der Gesamtisolatanzahl der getesteten Speziespopulation nicht übersteigen sollte.

Das Dendrogramm für den Mainzer Raum ergab 99 unterscheidbare Untergruppen, wovon 85 an der UMM und 49 am KKM nachgewiesen werden konnten. Die Mehrzahl der PFGE-Gruppen bestand aus einem bis zehn Isolaten (siehe Tabelle 18). Doch sowohl an der UMM als auch am KKM existierten drei bzw. vier Gruppen, welche  $\geq 5\%$  der Untersuchungsmenge enthielten.

	UMM	KKM
Untersuchungsmenge	762	352
5 % von der Untersuchungsmenge	38	18
<b>Gesamtzahl der PFGE-Gruppen</b>	<b>85 (100 %)</b>	<b>49 (100 %)</b>
< 10 Isolate	77 (91 %)	43 (88 %)
= 1 Isolat	42 (49 %)	25 (51 %)
≥ 10 Isolate	8 (9 %)	6 (12 %)
≥ 100 Isolate	1 (1 %)	1 (2 %)
≥ 5 % der Untersuchungsmenge	3 (3 %)	4 (8 %)

**Tabelle 18** Absolute und prozentuale Verteilung von PFGE-Gruppen, nach der Anzahl der zugehörigen Isolate, für die UMM und das KKM.

### 4.1.3 Untersuchungen zur caMRSA Detektion an der UMM

#### 4.1.3.1 Verbreitung des PVL-Gens

Da das PVL-Gen ein wichtiger Faktor bei der Bestimmung von caMRSA ist, wurden zunächst alle 762 MRSA Isolate der UMM auf das Vorhandensein dieses Gens getestet. Insgesamt konnten 45 (5,9 %) PVL-positive MRSA nachgewiesen werden (siehe Tabelle 19). Der prozentuale Anteil PVL-positiver MRSA unter allen Haut-/Schleimhautabstrichen betrug 5,5 % und unter allen Wundabstrichen 6,1 %.

KH-Nr	spa-Typ	PFGE-Gruppe	Abstrichart	KH-Nr	spa-Typ	PFGE-Gruppe	Abstrichart
KH043/04	t003	VI3	Haut	KH406/06	t002	VI7	Wunde
KH059/04	t003	VI19	Haut	KH490/06I	t008	XVIII1	Haut
KH095/04	t008	XVIII2	Wunde	KH495/06	t008	XVIII1	Haut
KH127/04	t008	XVIII2	Wunde	KH135/07	t008	XXIII1	Wunde
KH169/04	t003	VI3	Wunde	KH136/07	t003	VI3	Haut
KH224/04	t003	VI3	Haut	KH185/07	t008	XVIII2	Wunde
KH228/04	t003	VI3	Wunde	KH199/07	t003	VI3	Wunde
KH268/04	t003	VI3	Haut	KH228/07	t003	VI3	Wunde
KH342/04	t003	VI3	Wunde	KH261/07	t852	XXX4	Wunde
KH393/04	t044	XXXVII	Wunde	KH267/07	t019	XXXV1	Haut
KH448/04	t003	VI3	Wunde	KH304/07	t003	VI3	Haut
KH088/05I	t003	VI2	Haut	KH483/07	t019	XXXV1	Wunde
KH237/05I	t003	VI3	Wunde	KH497/07	t3948	VI3	Haut
KH297/05	t044	XXXVII	Wunde	KH074/08	t019	XXXV1	Wunde
KH336/05	t044	XXXVII	Wunde	KH171/08	t008	XVIII2	Haut
KH404/05	t003	VI13	Wunde	KH206/08	t474	XXX1	Haut
KH479/05	t003	VI3	Wunde	KH329/08	t008	XXIII1	Wunde
KH482/05	t008	XVIII3	Wunde	KH351/08	t044	XXXVI2	Wunde
KH504/05	t019	XXXV1	Wunde	KH467/08	t044	XXXVI1	Wunde
KH226/06	t003	VI17	Haut	KH612/08	t7634	VI1	Wunde
KH238/06	t003	VI19	Wunde	KH616/08	t044	XXXVI1	Wunde
KH359/06	t003	VI3	Wunde	KH764/08	t003	VI3	Wunde
KH403/06	t003	VI3	Wunde				

**Tabelle 19** Übersicht aller PVL-positiven MRSA an der UMM mit zugehörigem spa-Typ sowie der PFGE-Gruppe und der Abstrichart. Die Anordnung erfolgte nach Jahren, welches aus der KH-Nummer hinter dem / entnommen werden kann.

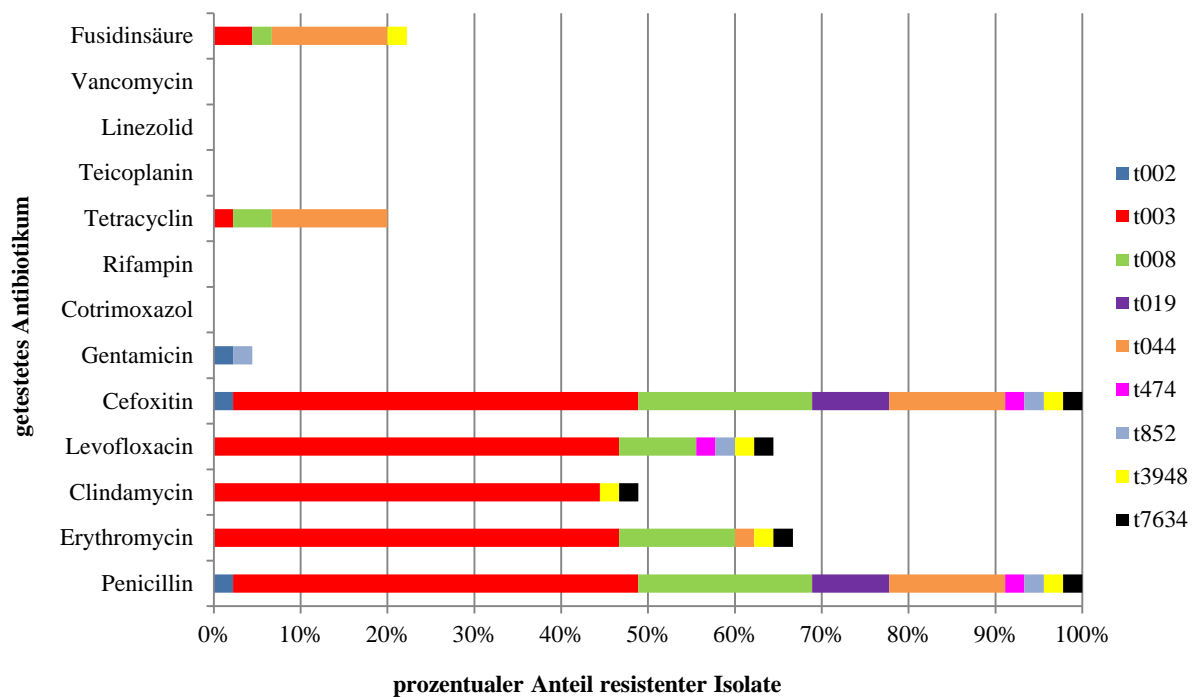
#### 4.1.3.2 Resistenztests

Um zu prüfen, ob die 45 PVL-positiven MRSA sich bezüglich ihrer Resistenzprägung von PVL-negativen MRSA unterscheiden, wurden zunächst die PVL-positiven Isolate bezüglich ihrer vorhandenen Resistenzen getestet. Um zu ermitteln, ob die Resistenzverteilung bei PVL-negativen MRSA ähnlich oder anders geartet ist, wurden im Anschluss auch diese Keime untersucht. In die Auswahl kamen zunächst alle spa-Typen, von denen sowohl PVL-positive als auch PVL-negative Isolate vorhanden waren. Daher wurden aufgrund der geringen Menge

## Ergebnisse

alle PVL-negativen t008 (8) und t002 (2) getestet. Da die Anzahl von t003-MRSA jedoch zu groß war, wurde auf Basis aller vorhandenen PVL-negativen t003 eine Zufallsstichprobe erstellt und diese 42 Keime analysiert. Weiterhin lagen von 21 zusätzlichen t003 Resistenztests vor, welche mit einbezogen wurden. Insgesamt wurden 63 PVL-negative t003 auf ihre Resistenz getestet. Von t044, t019, t852, t474, t3948 und t7634 existieren keine PVL-negativen Keime. Da eine Vergleichsstichprobe jedoch die Realität widerspiegeln sollte, wurde aus allen sonstigen PVL-negativen spa-Typen außer t003 und t008 ebenfalls eine Zufallsstichprobe von 47 Keimen gezogen und untersucht.

Verwendet wurden diejenigen Antibiotika, welche vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Mainz standardmäßig für die MRSA-/caMRSA-Diagnostik benutzt werden. Zusätzlich wurde die Resistenz auf Fusidinsäure getestet. Zu erwarten waren 100 % (45 Isolate) Resistenz für Penicillin und Cefoxitin, da alle MRSA gegen diese Antibiotika resistent sind. Zu beobachten war eine gehäufte Resistenz gegen Erythromycin (30 Isolate, 67 %), Levofloxacin (29 Isolate, 64 %) und Clindamycin (22 Isolate, 49 %) (siehe Abbildung 10). Vereinzelt traten Resistenzen gegen Fusidinsäure (10 Isolate, 21 %), Tetracyclin (9 Isolate, 19 %) und Gentamicin (2 Isolate, 4 %) auf. Die getesteten PVL-positiven MRSA besaßen zwischen zwei und sechs Resistenzen. Die genauen Ergebnisse pro Isolat sind in Tabelle A 8 dargestellt.



**Abbildung 10** Übersicht über die vorhandenen Resistenzen der 45 PVL-positiven Isolate.



## *Ergebnisse*

Da für eine Differenzierung die im Einzelnen aufgetretenen Resistenzmuster essentiell sind, wurden diese zusammen mit den jeweiligen spa-Typen in Tabelle 20 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Resistenzmuster PVL-negativer und -positiver MRSA voneinander unterscheiden. PVL-positive MRSA wiesen zwischen zwei und sechs Resistenzen unter den getesteten Antibiotika auf, wobei die meisten unterschiedlichen Kombinationen aus drei und vier Resistenzen bestanden. Die PVL-negativen MRSA hingegen wiesen zwischen zwei und acht Resistenzen auf, wobei die größte Vielfalt unter Mustern mit fünf und sechs Antibiotikaresistenzen auftrat. Auffällig war, dass unter den PVL-positiven MRSA lediglich zwei Muster mit einer Resistenz gegen Erythromycin, Clindamycin und Levofloxacin nachgewiesen wurden, während die Mehrzahl der PVL-negativen MRSA Resistenzen gegen diese drei Antibiotika besaßen.

Ergebnisse

spa-Typ	P	E	CL	LVX	FOX	GM	SXT	RA	TE	TEC	LZD	VA	FA
<b>PVL-positive MRSA</b>													
t003, t7634	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
t003, t3948	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
t008	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
t003, t008	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
t008	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
t008	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
t044	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
t474	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
t852	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
t008, t019	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
t002	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
t008	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
t044	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
<b>PVL-negative MRSA</b>													
t002, t003, t008, t014, t022, t024, t032, t045, t264, t1007, t1018	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
t001, t003, t535	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
t003, t008, t014	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S
t003	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
t003, t045, t535, t608	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
t003	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S
t008	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
t037	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R
t127	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
t024	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
t003, t008, t032	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
t008	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
t024, t032, t151	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
t004, t005, t015, t4484	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S

**Tabelle 20** Übersicht der aufgetretenen Resistenzmuster bei allen 45 PVL-positiven- und den 120 untersuchten PVL-negativen Isolaten, unterschieden anhand der spa-Typen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden alle Resistenzen rot unterlegt.

#### 4.1.3.3 Literaturrecherche zur Identifizierung klassischer caMRSA

Um zu untersuchen, bei welchen PVL-positiven MRSA es sich um caMRSA handelt, wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Gesucht wurden Publikationen über PVL-positive caMRSA, welche den in dieser Arbeit gefundenen PVL-positiven spa-Typen entsprechen, sowie das gleiche PFGE-Muster und eine ähnliche Resistenz aufweisen. Tabelle 21 zeigt die unter den 45 PVL-positiven Isolaten vorkommenden spa-Typen, sowie die PFGE-Gruppen, in welche dieser spa-Typ aufgrund seines spezifischen PFGE-Musters geclustert wurde. Die letzte Spalte gibt an, ob Publikationen über einen PVL-positiven MRSA, mit dem jeweiligen spa-Typ, dem zugehörigen PFGE-Muster und reduzierter Resistenz gefunden werden konnten.

spa-Typ/Anzahl	PFGE-Gruppe	caMRSA Publikationen
t002/1	VI7	-
t003/21	VI2-3, VI13, VI17, VI19	-
t008/9	XVIII1-3, XXIII1	alle USA300 caMRSA oder Varianten HAENNI <i>et al.</i> [106], TENOVER <i>et al.</i> [107]
t019/4	XXXV1	CHEUNG <i>et al.</i> [108]
t044/6	XXXVII-2	ANTRI <i>et al.</i> [109], WITTE <i>et al.</i> [110]
t474/1	XXX1	-
t852/1	XXX4	-
t3948/1	VI3	-
t7634/1	VII	-

**Tabelle 21** Verteilung der PVL-positiven MRSA auf spa-Typen und PFGE-Gruppen mit Angabe von Publikationen, welche die jeweiligen spa-Typen mit dem PFGE-Muster als caMRSA postulieren.

Wie aus Tabelle 21 ersichtlich, verteilten sich die 45 Isolate auf neun spa-Typen, welche in 17 PFGE-Gruppen geclustert wurden. Dabei war es möglich, dass in einer PFGE-Gruppe mehrere spa-Typen vorkamen (VI3 mit t003 und t3948), dass ein spa-Typ in mehrere PFGE Untergruppen geclustert wurde (t003 in VI2-3, VI13, VI17, VI19 und t044 in XXXVII-2), aber auch, dass ein spa-Typ zusätzlich in vollkommen unterschiedliche Obergruppen geclustert wurde (t008 in XVIII1-3, XXIII1).

Von den 45 PVL-positiven Isolaten gehörten sechs dem spa-Typ t044 und neun dem Typ t008 an. t044 ist laut WITTE *et al.* [110] der in Deutschland zurzeit vorherrschende caMRSA und bekannt als der europäische caMRSA-Klon [3]. Die PFGE-Muster dieses Typus entsprachen alle den bisher postulierten [109; 111]. ANTRI *et al.* [109] konnten für einzelne PVL-positive

## Ergebnisse

t044 unter anderem zusätzliche Resistenzen gegen Tetracyclin und/oder Erythromycin feststellen, wobei die Resistenzmuster oftmals keinen Einfluss auf das PFGE-Muster haben, denn gleiche spa-Typen mit unterschiedlichen Resistenzen können durchaus dieselben PFGE-Muster aufweisen. Alle sechs t044 dieser Arbeit waren Tetracyclin resistent, wovon einer eine zusätzliche Erythromycinresistenz aufwies. Bei den PVL-positiven t008 handelte es sich den PFGE-Mustern nach um den bekannten USA300 caMRSA bzw. um Varianten von diesem [106; 107; 112; 113]. Nach LARSEN *et al.* [112] ist es ausreichend, bei einem Nachweis von t008 die Existenz des PVL-Gens zu bestimmen, um einen USA300 nachzuweisen. Diese These konnte anhand der vorliegenden Daten bestätigt werden. LARSEN *et al.* [112] berichten für PVL-positive t008-caMRSA von einer Erythromycinresistenz von 82 % aller getesteten Isolate, 8 % für Tetracyclin und 13 % für Clindamycin. Die vorliegenden neun t008 PVL-positiven Isolate wiesen neben den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika noch Resistenzen gegen Erythromycin (66,67 %), Levofloxacin (44,44 %) und Tetracyclin (22,22 %) auf.

Unter den PVL-positiven Isolaten sind auch alle vier an der UMM detektierten t019. Deren einheitliches PFGE-Muster wurde für diesen spa-Typ von CHEUNG *et al.* [108] als caMRSA postuliert. Bezeichnend ist die reduzierte Resistenz nur gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.

Die spa-Typen t002, t003 zählen beide zu ST5-MRSA-II aus dem pandemischen klonalen Komplex 5 (CC 5), welcher aufgrund seiner außergewöhnlich vielen genetischen Polymorphismen wahrscheinlich polyphyletischen Ursprungs ist [3]. MÜLLER-PREMRU *et al.* [114] berichten von einem caMRSA-Ausbruch unter slowenischen Football-Spielern mit PVL-positiven t002. Leider wurde das PFGE-Muster dieser Stämme nicht angegeben. HETEM *et al.* [115] ordnen den von ihnen untersuchten PVL-positiven t002 anhand des bisher nicht als caMRSA bekannten Genotyps als haMRSA ein. Die Einstufung eines PVL-positiven t002 als ca- bzw. haMRSA ist somit in der Literatur nicht eindeutig.

Die einundzwanzig PVL-positiven t003 sowie die verwandten spa-Typen t3948 und t7634 wiesen bis auf eine Clindamycin-sensible-Tetracyclin-resistente-t003-Ausnahme alle Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Erythromycin, Clindamycin und Levofloxacin auf. Die mit t032 verwandten Stämme t474 und t852 besaßen beide neben der  $\beta$ -Lactam- auch eine Levofloxacinresistenz und t852 war zusätzlich noch gegen Gentamicin resistent. Für diese MRSA existiert keine Literatur, welche diese Keime als caMRSA einstuft.

Letztendlich konnten nur die PVL-positiven Isolate der spa-Typen t008, t019 und t044 in Kombination mit dem für, diese Keime, vorliegenden PFGE-Muster als klassische caMRSA identifiziert werden. Dies entspricht 42 % aller PVL-positiven MRSA (19 von 45), welche

## Ergebnisse

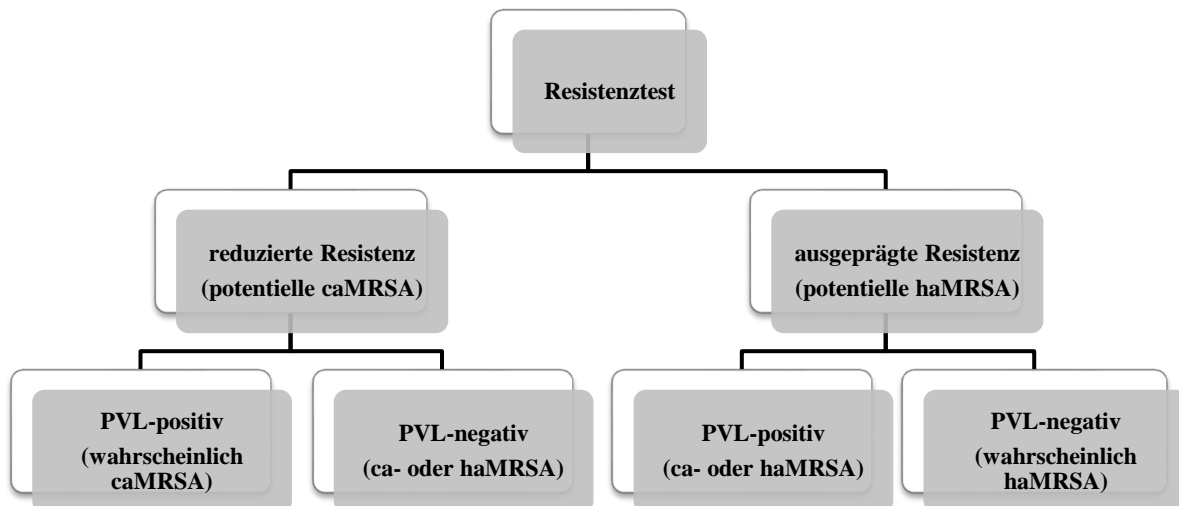
anhand ihrer spezifischen Genotypen mit caMRSA assoziiert wurden. In Tabelle 22 wurden zum besseren Verständnis die mikrobiologischen Eigenschaften aufgelistet, welche in der vorliegenden Arbeit zur Unterscheidung von ca- und haMRSA herangezogen wurden.

<b>Eigenschaften klassischer caMRSA</b>
reduzierte Resistenz (sensibel gegen Erythromycin, Clindamycin und/oder Levofloxacin)
PVL-positiv
spa-Typen: t008, t019, t044
keine Ähnlichkeiten mit PFGE-Mustern von lokal vorherrschenden haMRSA
<b>Eigenschaften atypischer caMRSA</b>
zumeist reduzierte Resistenz (sensibel gegen Erythromycin, Clindamycin und/oder Levofloxacin)
PVL-negativ
spa-Typen: unterschiedlich, doch die phylogenetische Zugehörigkeit zu erfolgreichen caMRSA kann zumeist hergestellt werden (ST1, ST59, ST5, ST72) [43; 44; 116; 117]
keine Ähnlichkeiten mit PFGE-Mustern von lokal vorherrschenden haMRSA
<b>Eigenschaften haMRSA</b>
gering bis stark ausgeprägte Multiresistenz
≥ 95 % PVL-negativ
spa-Typen: bekannteste in Deutschland: t003, t032
sind zumeist die dominierenden lokalen PFGE-Muster, zumindest in der vorliegenden Arbeit

**Tabelle 22** Eigenschaften klassischer- und atypischer caMRSA sowie haMRSA, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

### 4.1.3.4 Methodik zur Diagnostik klassischer PVL-positiver caMRSA

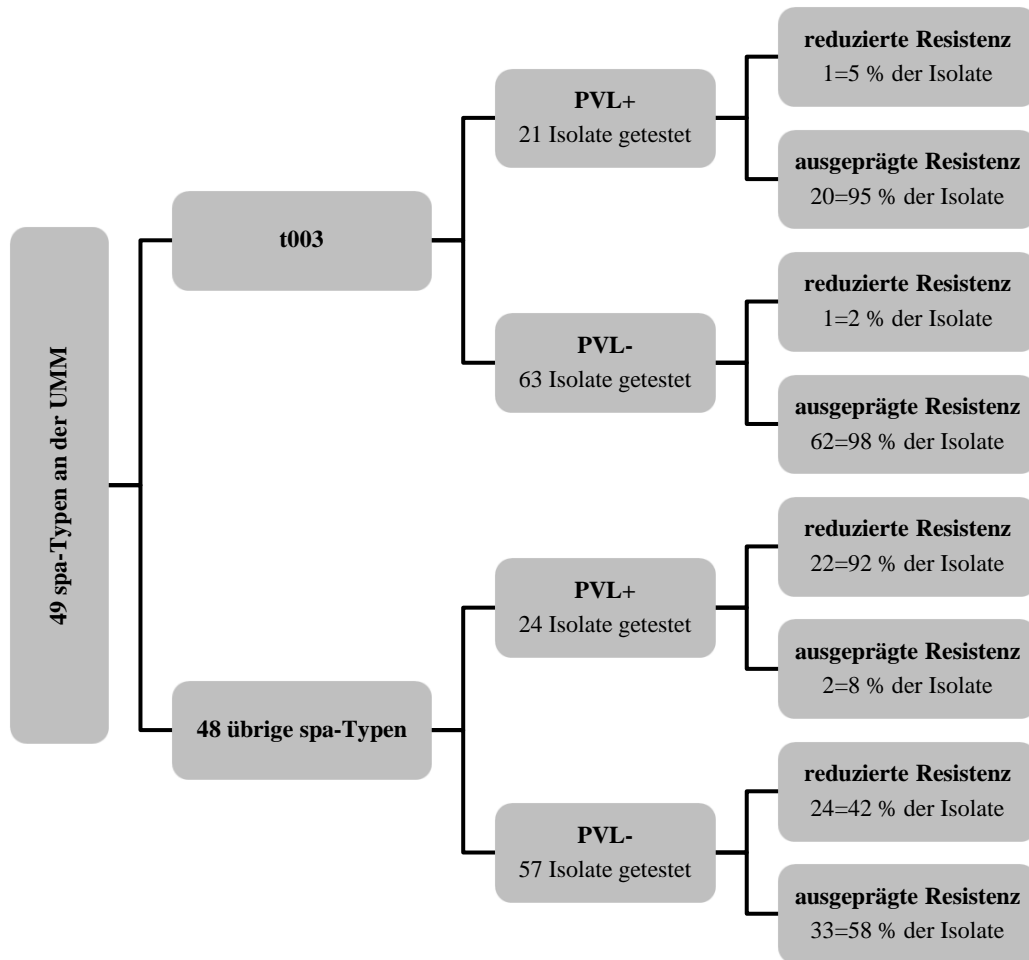
Wie in Tabelle 1 ausgeführt, liegen laut Literatur die genotypischen Unterschiede von ca- und haMRSA im Bereich der Resistenzen und des PVL-Gens. Daher sollte es möglich sein, einen klassischen caMRSA anhand seiner reduzierten Resistenz zu erkennen und die Diagnose mittels PVL-Nachweis zu sichern (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11** Schematische Unterteilung von MRSA anhand ihrer Resistenz und des PVL-Status samt möglicher Einordnung als ca- oder haMRSA.

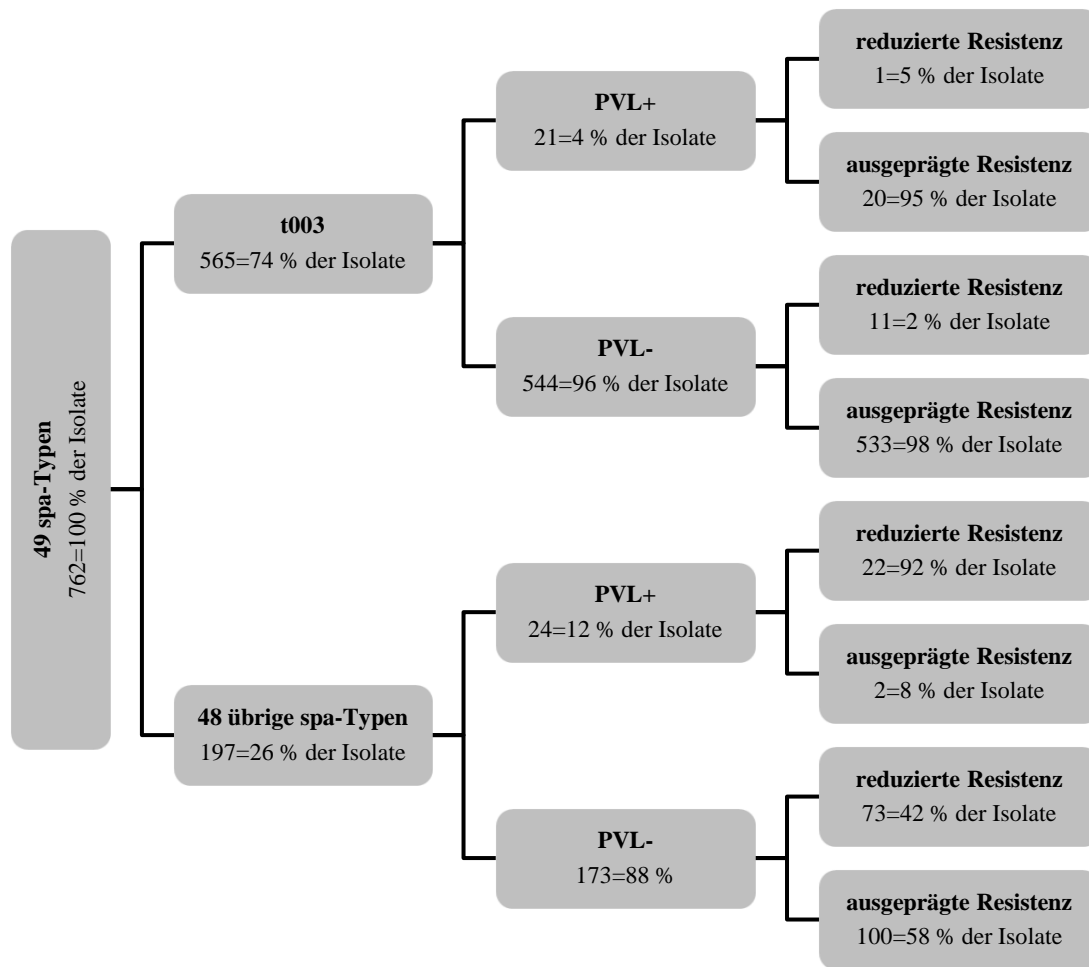
Da ein Vergleich der Resistogramme von PVL-positiven und -negativen MRSA (siehe Tabelle 20) darauf hindeutete, dass PVL-negative MRSA häufiger Resistenzen für Erythromycin, Clindamycin und Levofloxacin aufwiesen, wurde auf dieser Basis das Auswahlkriterium für potentielle caMRSA festgelegt. Im Folgenden wurden alle Keime, welche sensibel auf Erythromycin und/oder Clindamycin und/oder Levofloxacin getestet wurden, als MRSA mit reduzierter Resistenz eingeordnet. Keime mit Resistenzen für diese Antibiotika galten als MRSA mit ausgeprägter Resistenz.

Zunächst sollte sichergestellt werden, dass der zu 74 % an der UMM vorherrschende t003 in die richtige Resistenz-Kategorie eingeordnet wird, denn wenn bei diesem spa-Typ reduzierte Resistenzen vorherrschend wären, könnte keine suffiziente Abtrennung von den übrigen spa-Typen erfolgen. Hierfür wurden zwei Gruppen gebildet. Eine beinhaltete alle t003 und die andere alle übrigen spa-Typen. Jede dieser Gruppen wurde in PVL-positive und PVL-negative Isolate unterteilt und basierend auf den in Kapitel 4.1.3.2 durchgeführten Resistenztests wurde die prozentuale Verteilung auf die jeweiligen Resistenzen ermittelt. Insgesamt wurden 21 PVL-positive- und 63 PVL-negative t003 sowie 24 PVL-positive- und 57 PVL-negative weitere spa-Typen auf ihre Resistenz untersucht (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12** Übersicht über die prozentuale Verteilung der Resistenzausprägungen auf PVL-positive und -negative t003 sowie die 48 übrigen spa-Typen. Die Werte ergaben sich aus den auf Resistenz getesteten Stichproben (siehe Kapitel 4.1.3.2).

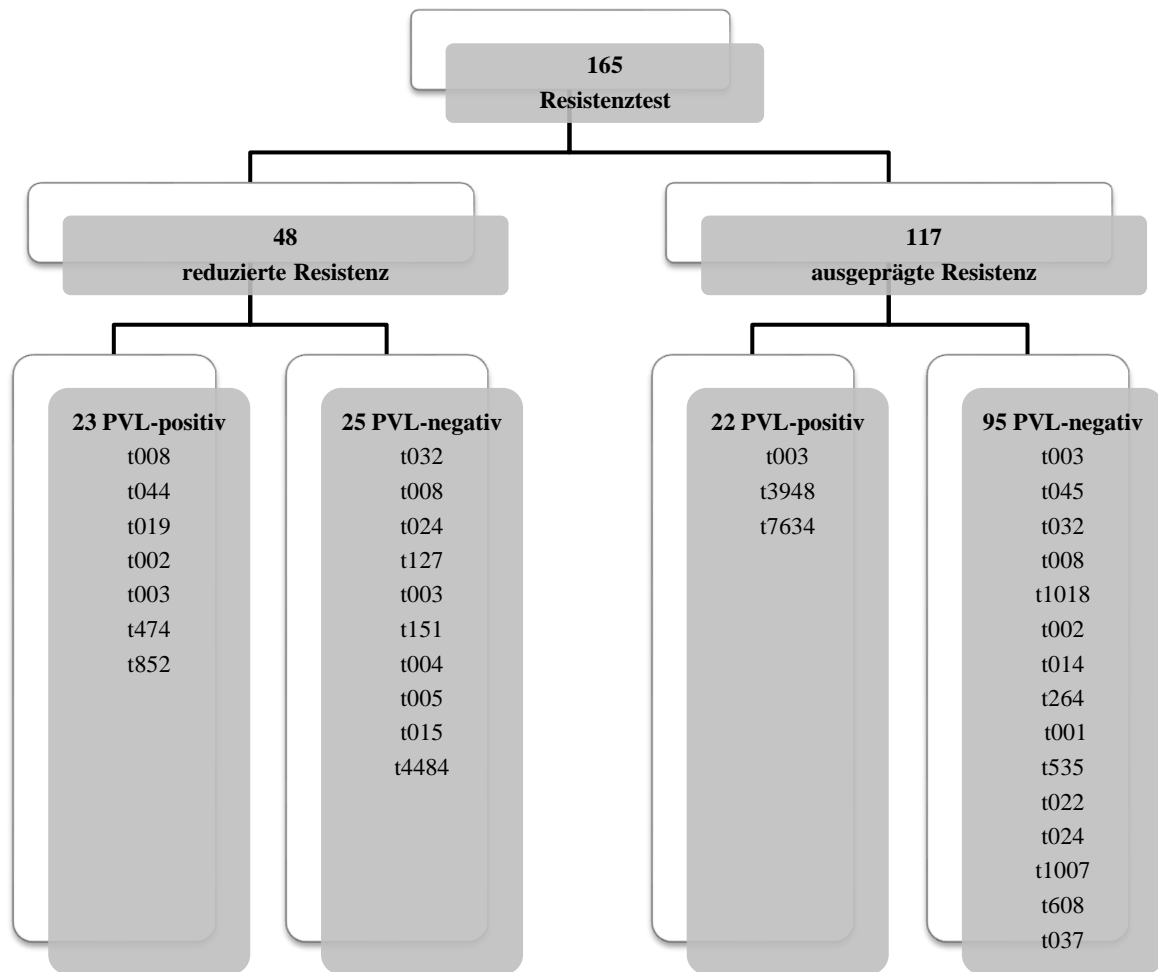
Aus den, für die Stichproben, ermittelten prozentualen Anteilen wurde eine Extrapolation auf die Gesamtmenge aller 762 an der UMM untersuchten MRSA durchgeführt (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13** Übersicht über die prozentuale Verteilung PVL-positiver und -negativer MRSA innerhalb des spa-Typs t003 und der 48 übrigen spa-Typen, mit Angabe der Anzahl/des Prozentsatzes reduzierter/ausgeprägter Resistenzen. Die Isolatzahlen für die Resistenzen der PVL-negativen Isolate wurden, basierend auf den Ergebnissen aus Abbildung 12, extrapoliert.

Aus der Übersicht wird deutlich, dass PVL-positive von PVL-negativen t003 anhand der Resistenz nicht unterschieden werden können. In beiden Fällen herrschten zu 98 % bzw. 95 % ausgeprägte Resistenzen vor und reduzierte Resistenzen bildeten die absolute Minderheit. In der Gruppe der übrigen spa-Typen existierte zwar für PVL-positive Isolate mit 92 % eine eindeutige Tendenz zur Ausprägung reduzierter Resistenzen, doch unter den PVL-negativen Isolaten war die Verteilung mit 58 % zu 42 % nicht so deutlich. Um zu klären, ob die Vorselektion anhand des Resistenzmusters trotzdem eine praktikable Methodik darstellt, wurden die in die jeweiligen Gruppen des Entscheidungsbaums (siehe Abbildung 11) eingeordneten spa-Typen festgestellt. Hierfür wurden alle 165 durchgeführten Resistenztest zunächst anhand der vorliegenden reduzierten- bzw. ausgeprägten Resistenz unterschieden und dann noch einmal anhand des PVL-Status des jeweiligen Keims (siehe Abbildung 14).





**Abbildung 14** Übersicht der spa-Typenverteilung für alle auf ihre Resistenz getesteten Isolate, aufgetrennt nach reduzierter-/ausgeprägter Resistenz und vorhandenem -/nicht vorhandenem PVL-Gen.

Was in Abbildung 13 angedeutet wurde, bestätigte sich in Abbildung 14. Es zeigte sich, dass unter den MRSA mit reduzierter Resistenz mehr PVL-negative Isolate und spa-Typen auftreten, als PVL-positive MRSA. Weiterhin wurde sichtbar, dass nicht nur die klassischen caMRSA eine reduzierte Resistenz und das PVL-Gen aufweisen. Außerdem kamen auch unter den Keimen mit ausgeprägter Resistenz PVL-positive Isolate vor, die bisher in Publikationen nicht als caMRSA in Erscheinung getreten sind. Da in der vorliegenden Arbeit neben der spa-Typisierung auch eine PFGE für alle Keime durchgeführt wurde, war es möglich, die fraglichen Isolate auf ihre phylogenetische Zugehörigkeit zu ca- bzw. haMRSA zu untersuchen, denn caMRSA sollen laut SAID-SALIM *et al.* eine genetische Verschiedenheit von lokalen Klonen aufweisen [118]. Für alle in der vorliegenden Arbeit als caMRSA identifizierten Keime traf dies bezüglich der PFGE-Schnittmuster auch zu. Die PFGE-Muster aller PVL-positiven t003 mit ausgeprägter Resistenz befanden sich in der PFGE Obergruppe VI, und zeigten somit keine phylogenetischen Unterschiede zu den PVL-negativen t003 mit

## Ergebnisse

ausgeprägter Resistenz. Auch wurde lediglich eine Publikation gefunden, welche von PVL-positiven t003 berichtet und diese als ha- oder hcaMRSA (hospital acquired community associated MRSA, im Krankenhaus erworbener aber bevölkerungsassoziierter MRSA) einstuft [119]. Außer t003 wurden noch t3948 und t7634 in die Gruppe der PVL-positiven mit ausgeprägter Resistenz eingeordnet. Diese beiden Keime sind Abkömmlinge von t003 (siehe Tabelle A 6). Ein Vergleich der Repeatsequenzen ergab, dass per Deletion der Repeatfolge 17-20-17 aus t003 der spa-Typ t3948 entstanden ist. Auch das PFGE-Schnittmuster ergab eine Zugehörigkeit zur t003 dominierten Obergruppe VI. Aus t3948 ist durch mehrere genetische Events der spa-Typ t7634 hervorgegangen. Das PFGE-Muster dieses Keims wird ebenfalls in die Obergruppe VI geclustert, wodurch auch in diesem Fall die nahe Verwandtschaft beider Isolate zu den lokalen t003 bewiesen wurde.

Für alle PVL-negativen Isolate mit ausgeprägter Resistenz konnte weder eine Übereinstimmung bezüglich der Resistenzausprägung, des spa-Typs und des PFGE-Musters mit bekannten PVL-negativen- noch mit PVL-positiven caMRSA festgestellt werden. Isolate aus Abbildung 14, egal ob PVL-positiv oder -negativ, welche eine ausgeprägte Resistenz aufweisen wurden somit als haMRSA angesehen.

Da MRSA mit reduzierter Resistenz prinzipiell caMRSA darstellen könnten, wurden alle in diese Gruppe eingeordneten Keime auf das Vorhandensein des PVL-Gens getestet. Daraus ergaben sich zwei Gruppen, die PVL-positiven- und PVL-negativen MRSA (siehe Abbildung 14). Da die Gruppe der PVL-negativen Keime mit reduzierter Resistenz eine Mischung aus ca- und haMRSA spa-Typen aufwies, wurde die phylogenetische Zugehörigkeit untersucht. Bei den fraglichen caMRSA handelte es sich um Isolate des spa-Typs t008. Ein Vergleich aller t008-PFGE-Schnittmuster ergab, dass PVL-positive und -negative t008 mit reduzierter Resistenz in vollkommen unterschiedliche Obergruppen geclustert wurden und zudem auch keine Ähnlichkeiten zu den PVL-negativen t008 mit ausgeprägter Resistenz aufwiesen. Demnach ist eine Verwandtschaft anhand der Kriterien nach TENOVER *et al.* [78] ausgeschlossen. Da außerdem keine Übereinstimmung mit klassischen t008 caMRSA-PFGE-Mustern festgestellt werden konnte, wurden alle PVL-negativen t008 als haMRSA angesehen. Die restlichen PVL-negativen spa-Typen mit reduzierter Resistenz werden in der Literatur nicht mit caMRSA in Verbindung gebracht. Ein Vergleich der PFGE-Muster der PVL-negativen spa-Typen t032, t024 und t003, welche sowohl reduzierte- als auch ausgeprägte Resistenzen aufwiesen zeigte ein homogenes Bild, welches auf eine Verwandtschaft der Isolate beider Gruppen hindeutet. So wurden alle t032 bis auf einen Keim mit ausgeprägter

## Ergebnisse

Resistenz (XXXI) in die Obergruppe XXX eingeordnet. Bei den Isolaten des spa-Typs t024 wurden alle bis auf den Keim mit ausgeprägter Resistenz (XV) in die Obergruppe XX geclustert. Und der eine t003 mit reduzierter Resistenz wurde wie die Mehrzahl der t003 mit ausgeprägter Resistenz ebenfalls in die Obergruppe VI geclustert. Die Ähnlichkeit zu lokal vorherrschenden hospitalassoziierten MRSA ist demzufolge nachgewiesen.

Da es sich bei den restlichen spa-Typen aus der Gruppe der PVL-negativen Keime mit reduzierter Resistenz auch um haMRSA assoziierte spa-Typen handelt und zu den vertretenen spa-Typen keine Literatur gefunden werden konnte, welche diese Keime mit den vorliegenden Eigenschaften als atypische PVL-negative caMRSA einstuft, wurden diese Isolate ebenfalls als haMRSA angesehen.

Die letzte Gruppe der PVL-positiven MRSA mit reduzierter Resistenz stellt diejenige dar, welche hauptsächlich die klassischen caMRSA enthalten sollte, wenn die angewandte Selektionsmethode funktioniert. Unter den 23 PVL-positiven spa-Typen mit reduzierter Resistenz befanden sich neun t008, sechs t044 und vier t019. Mit diesen drei spa-Typen wird üblicherweise caMRSA assoziiert (siehe Tabelle 21). Der spa-Typ t008 war außer in der Gruppe der PVL-positiven Keime mit ausgeprägter Resistenz überall vertreten. Zusätzlich zeigte sich dieser spa-Typ sehr heterogen, was die ausgeprägten Resistenzmuster und PFGE-Gruppen anbelangte. So wurden unter den neun PVL-positiven t008 sechs Resistenzmuster gefunden und weitere fünf Muster für die acht PVL-negative Isolate. Außerdem wurden die insgesamt siebzehn t008 der UMM in zehn unterschiedliche PFGE-Gruppen geclustert, doch für alle neun PVL-positiven Isolate mit reduzierter Resistenz konnte die Verwandtschaft zu dem bekannten USA300 caMRSA per PFGE eindeutig nachgewiesen werden (PFGE-Gruppen XVIII1-3 und XXIII1). HETEM *et al.* [115] erklären in ihrer Arbeit auch nur PVL-positive t008 zu caMRSA und laut WITTE *et al.* [120] ist bisher kein PVL-positiver t008 bekannt, bei welchem keine Verwandtschaft zu USA300 nachweisbar war. Somit wurden PVL-positive t008 mit reduzierter Resistenz als caMRSA eingestuft.

Die untersuchten t044 und t019 aus dieser Arbeit entsprachen ohne Ausnahme dem postulierten Bild von typischen caMRSA [108; 109; 111]. Alle bis auf einen erythromycinresistenten t044 waren sensibel gegen Erythromycin, Clindamycin und Levofloxacin und wiesen außerdem eine Resistenz gegen Tetracyclin und Fusidinsäure auf. Die t019 zeigten nur gegen  $\beta$ -Lactame eine Resistenz. Die einzelnen Isolate der beiden spa-Typen zeigten sich als eng verwandt, denn alle Isolate des spa-Typs t044 wurden in die PFGE-Obergruppe XXXVI und alle t019 in XXXV geclustert.

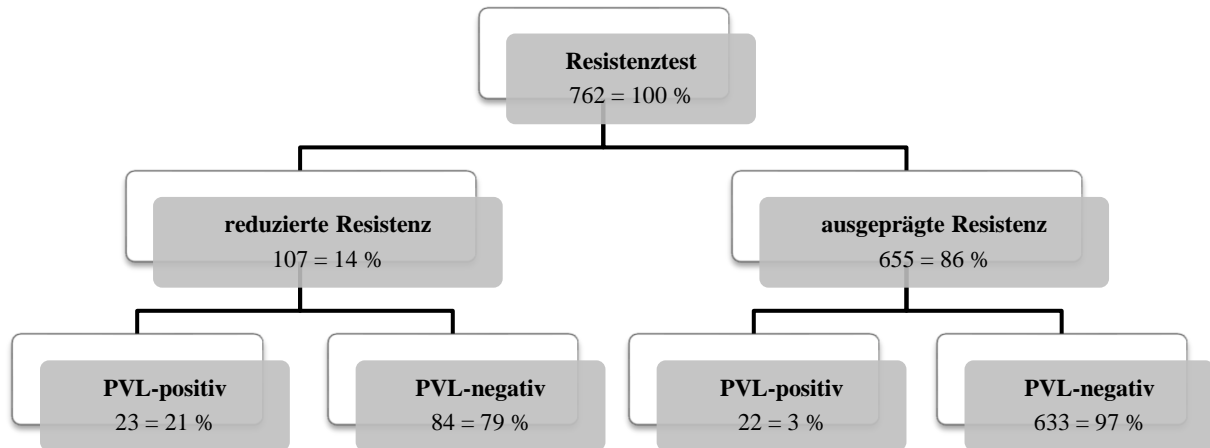
## Ergebnisse

Der PVL-positive t002 wies im Gegensatz zu den PVL-negativen t002 keine Resistenz gegenüber Erythromycin, Clindamycin und Levofloxacin auf. Dieser spa-Typ ist nicht für typische caMRSA-Infektionen bekannt, daher ist die Einordnung auch in der Literatur unklar. MÜLLER-PREMUR *et al.* [114] berichten von einem caMRSA Ausbruch unter slowenischen Football Spielern mit PVL-positiven t002 und HETEM *et al.* [115] ordnen ihren PVL-positiven t002 anhand des nicht als caMRSA bekannten Genotyps als haMRSA ein. Der PVL-positive t002 in dieser Arbeit wurde anhand des PFGE-Musters zwar in eine eigene Gruppe (VI7) geclustert, befand sich aber in der Obergruppe VI, in welche auch die anderen beiden haMRSA assoziierten t002-Isolate eingeordnet wurden. Die enge Verwandtschaft dieser Isolate konnte demnach belegt werden.

Bei dem PVL-positiven spa-Typ t474 mit reduzierter Resistenz handelte es sich um einen Abkömmling des epidemischen t032 [121], welcher nur als haMRSA bekannt ist. Dies trifft ebenfalls für t852 zu, bei welchem es sich um den epidemischen EMRSA-15 Klon [122; 123] handelte. Dieser EMRSA ist sowohl mit als auch ohne PVL-Gen bekannt, jedoch nicht als caMRSA eingestuft [123-126]. Sowohl t474 als auch t852 waren vom PFGE-Muster her identisch mit den lokalen t032, womit die enge genetische Verwandtschaft der Keime zu einem typischen haMRSA gezeigt werden konnte.

Von den 23 potentiellen caMRSA, wurden 19 als klassische caMRSA bestätigt und richtig erkannt. Die vier sonstigen PVL-positiven MRSA mit reduzierter Resistenz wurden aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaft zu typischen haMRSA auch als solche angesehen.

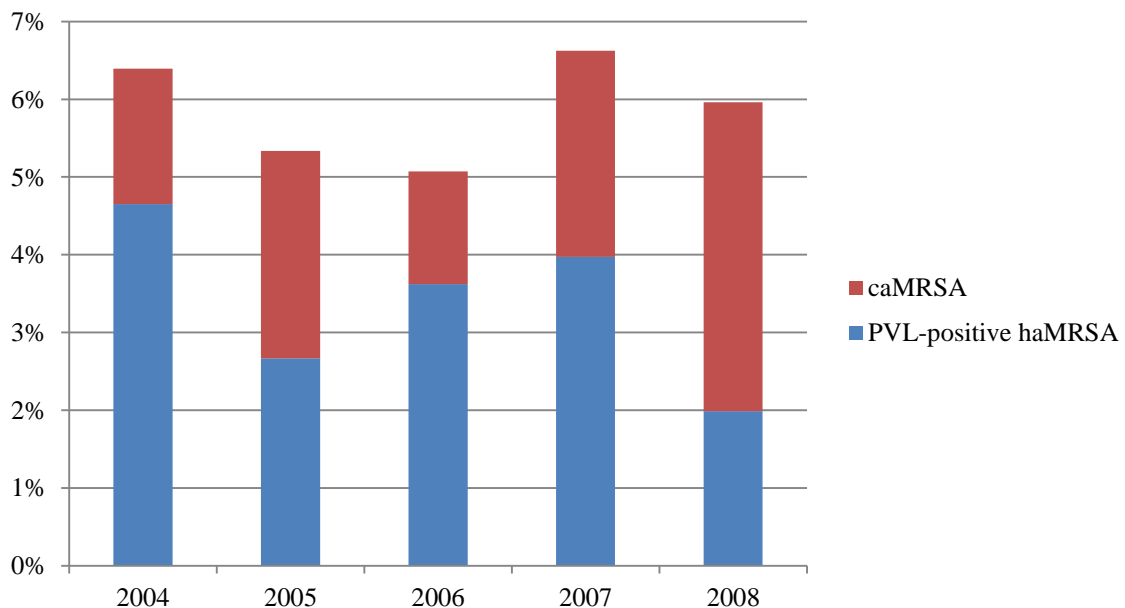
Um den Arbeitsaufwand der hier vorgestellten Methode zur Identifikation klassischer PVL-positiver caMRSA abschätzen zu können, wurden die extrapolierten Ergebnisse aus Abbildung 13 auf das in Abbildung 11 vorgestellte Schema zur Identifikation von caMRSA angewandt (siehe Abbildung 15). Aus den Zahlen wurde ersichtlich, dass an der UMM lediglich 14 % aller MRSA eine reduzierte Resistenz aufwiesen und davon 21 % PVL-positiv waren.



**Abbildung 15** Extrapolation der zu erwartenden Ergebnisse auf alle 762 getesteten MRSA-Isolate der UMM, basierend auf den Berechnungen aus Abbildung 13.

#### 4.1.3.5 Verbreitung klassischer caMRSA und PVL-positiver haMRSA

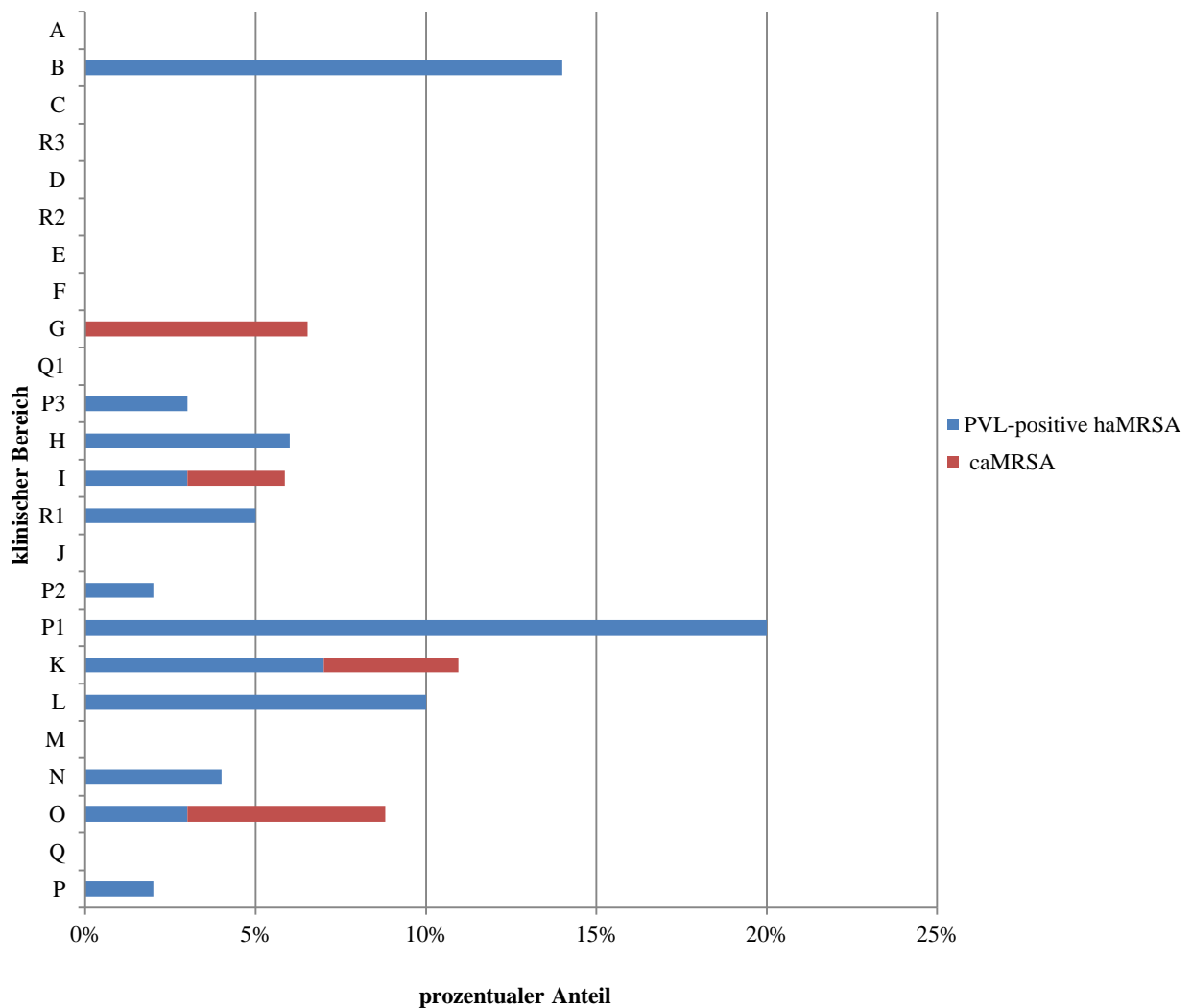
Da sowohl die Zunahme von PVL-positiven MRSA allgemein, als auch speziell von caMRSA in einigen Ländern ein großes Problem darstellt, sollte die zeitliche Entwicklung dieser beiden MRSA-Gruppen analysiert werden. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, schwankte der Anteil von caMRSA innerhalb von fünf Jahren zwischen 1,5 % und 4,0 %. Die PVL-positiven haMRSA erreichten Minimum 2,0 % und Maximum 4,7 %. Somit schwankte der Anteil aller PVL-positiven MRSA lediglich zwischen 5,1 % und 6,6 % innerhalb von fünf Jahren.



**Abbildung 16** Jährlicher prozentualer Anteil aller PVL-positiven MRSA mit Differenzierung zwischen PVL-positiven haMRSA und caMRSA während des Untersuchungszeitraums 2004-2008 an der UMM.

## Ergebnisse

Da caMRSA potentiell in anderen klinischen Bereichen als haMRSA zu erwarten sind, sollte eine Analyse zur Verteilung innerhalb der UMM zeigen, ob dies auch auf die caMRSA der vorliegenden Arbeit zutrifft (siehe Abbildung 17). Hierfür wurde die Gesamtzahl aller MRSA eines jeden klinischen Bereichs als 100 % angenommen und davon der prozentuale Anteil PVL-positiver haMRSA und caMRSA berechnet. Dies bedeutet, dass z. B. im klinischen Bereich A 100 % PVL-negative haMRSA vorkamen, während sich der Bereich I jeweils zu 3 % aus PVL-positiven- und caMRSA, sowie 94 % PVL-negativen MRSA zusammensetzt.



**Abbildung 17** Verteilung klassischer PVL-positiver caMRSA im Vergleich zu PVL-positiven MRSA in unterschiedlichen klinischen Bereichen.

Aus Abbildung 17 wird ersichtlich, dass sich das Vorkommen klassischer caMRSA auf lediglich vier klinische Bereiche beschränkt, während die PVL-positiven haMRSA eine weitere Verbreitung innerhalb der Klinik aufwiesen.

## Ergebnisse

Da das Auftreten von caMRSA in so wenigen klinischen Bereichen eine temporäre Ausbreitung vermuten lässt, wurden die Isolate noch einmal hinsichtlich ihrer zeitlichen Persistenz untersucht (siehe Tabelle 23).

KH-Nr.	spa-Typ	klinischer Bereich
<b>Jahr 2004</b>		
095/04	t008	O6
127/04	t008	O18
393/04	t044	K1
<b>Jahr 2005</b>		
482/05	t008	K3
504/05	t019	K4
336/05	t044	O6
297/05	t044	O2
<b>Jahr 2006</b>		
490/06	t008	G
495/06	t008	G
<b>Jahr 2007</b>		
135/07	t008	K2
185/07	t008	O18
267/07	t019	I
483/07	t019	K4
<b>Jahr 2008</b>		
171/08	t008	G
329/08	t008	O7
074/08	t019	O6
351/08	t044	O6
467/08	t044	K4
616/08	t044	O6

**Tabelle 23** Übersicht der jährlichen Verteilung klassischer caMRSA mit Angabe des klinischen Bereiches und der Station. Die KH-Nr. ist die Krankenhaushygiene Einfriernummer des jeweiligen Isolates, welche sich zusammensetzt aus einer fortlaufenden Nr./dem Jahr.

Es zeigten sich lediglich in den Jahren 2006 (KH-Nr. 490/06 und 495/06) und 2008 (KH-Nr. 351/08 und 616/08) Auffälligkeiten. 2006 wurden kurz nacheinander zwei t008 auf derselben Station des Bereiches I isoliert. Der Abstrich von 490/06 wurde am 20.11.2006 entnommen

## *Ergebnisse*

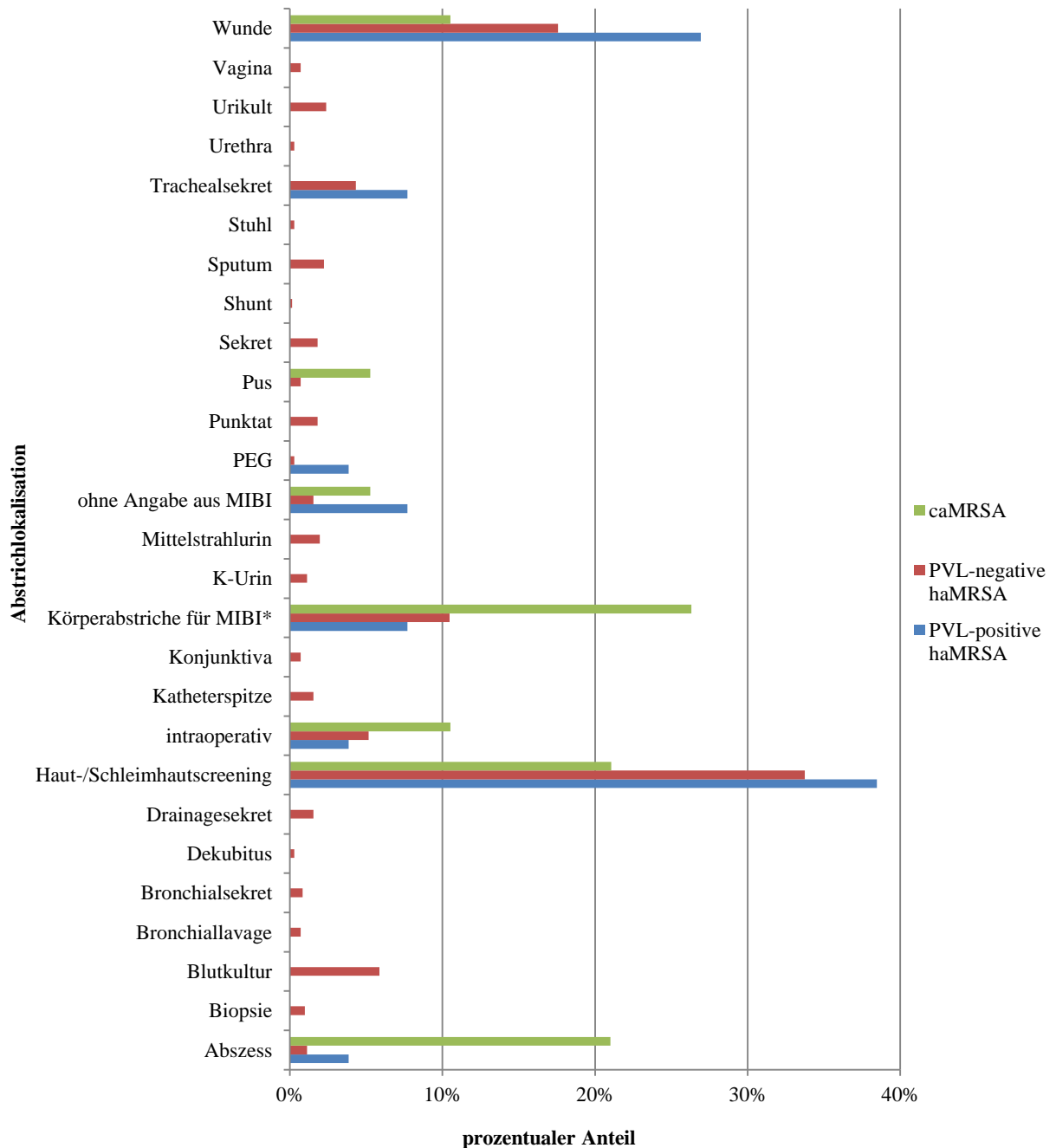
und der von 495/06 am 22.11.2006. Bei weiterer Recherche stellte sich heraus, dass es sich bei dem Isolat 495/06 um die Mutter des Kindes mit der KH-Nr. 490/06 handelte. Hinsichtlich der Resistenzausprägung beider Keime bestand ein Unterschied, da das Isolat des Patienten 490/06 auf Erythromycin sensibel reagierte, während das von Patient 495/06 eine Erythromycinresistenz aufwies. Die beiden Isolate des spa-Typs t044 aus dem Jahr 2008 wurden zwar aus zwei unterschiedlichen Abteilungen des klinischen Bereichs VM eingeschickt, da es sich jedoch um denselben spa-Typ und vollkommen übereinstimmende Resistenzmuster handelte, wurden diese Keime näher überprüft. Die Entnahmedaten der Abstriche lagen weit auseinander. Der Abstrich von 351/08 wurde am 27.06.2008 entnommen und von 616/08 am 13.10.2008. Anhand der sonstigen vorliegenden Daten konnte keinerlei Beziehung zwischen den Patienten festgestellt werden.

Da caMRSA bevorzugt Haut- und Weichgewebeeinfektionen verursachen sollen (siehe Tabelle 1), wurden die Abstrichlokalisationen aller klassischen caMRSA mit denen von PVL-positiven- und -negativen haMRSA verglichen und auf eine Häufung in diesen Bereichen untersucht (siehe Abbildung 18). Für jede der drei MRSA-Gruppen wurde der prozentuale Anteil an jeder Abstrichlokalisation berechnet. Die Summe aller nachgewiesenen MRSA aus einer der drei Gruppen ergibt jeweils 100 %. Es zeigte sich, dass PVL-negative haMRSA ein breiteres Spektrum an Abstrichlokalisationen aufwiesen als PVL-positive haMRSA und caMRSA. Für Lokalisationen, welche MRSA aus allen drei Gruppen aufwiesen, zeigten sich teilweise große Verteilungsunterschiede. Unter den Abszessabstrichen konnten prozentual gesehen fünfmal so häufig caMRSA detektiert werden, als PVL-positive haMRSA und der prozentuale Anteil PVL negativer haMRSA war 19mal geringer. Im Bereich intraoperativer Abstriche war das Verhältnis von PVL-positiven- und -negativen haMRSA annähernd ausgewogen, doch prozentual gesehen wurden doppelt so viele caMRSA diagnostiziert. Die Abstrichlokalisation mikrobiologischer Körperabstriche wurde zu 26 % dominiert von caMRSA, gefolgt von 10 % PVL-negativen- und 8 % PVL-positiven haMRSA. Für die Abstrichlokalisation PEG konnten keine caMRSA, dafür jedoch prozentual gesehen zwölfmal mehr PVL-positive- als PVL-negative haMRSA beobachtet werden. Ähnlich verhielt es sich auch für Trachealsekretabstriche, in denen PVL-positive haMRSA zu 8 % gegenüber 4 % PVL-negativen haMRSA auftraten. Im Bereich der Wundabstriche zeigte sich ein zu 27 % verstärktes Vorkommen von PVL-positiven- gegenüber 18 % PVL-negativen haMRSA und 11 % caMRSA. In der Abstrichlokalisation Haut-/Schleimhaut wiesen alle drei MRSA-



## Ergebnisse

Gruppen sehr hohe, bzw. die höchsten prozentualen Anteile unter allen Lokalisationen auf. Lediglich caMRSA wurden häufiger im Bereich der mikrobiologischen Körperabstriche nachgewiesen. Der zweithäufigste Nachweis von caMRSA erfolgte mit jeweils 21 % in Haut-/Schleimhautabstrichen und Abszessen. Die PVL-positiven und -negativen haMRSA wurden am häufigsten in Haut-/Schleimhautabstrichen und danach in Wundabstrichen detektiert.



**Abbildung 18** Vergleichende Darstellung zum prozentualen Vorkommen von PVL-negativen- und -positiven-haMRSA, sowie klassischen caMRSA an der UMM. Die Summe jeder Gruppe ergibt jeweils 100 %. Erklärung: \*ohne Angabe ob es sich um Wunden oder intraoperativ entnommene Abstriche handelt.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Molekulare Epidemiologie von MRSA**

Laut Literaturquellen ist die Diversität von MRSA stark ortsbezogen und für jedes Klinikum kann eine ganz eigene MRSA-spa-Typen-Verteilungsrate existieren [7; 97]. Für epidemische Stämme wird postuliert, dass diese für einige Jahre plötzlich an einem Standort verstärkt auftreten können, um dann sukzessive abzunehmen oder ganz zu verschwinden [5; 7]. Da Untersuchungen dieser Art bisher nicht im Mainzer Raum durchgeführt wurden, existieren keine Informationen zur vorherrschenden lokalen Situation in dieser Region. Die Daten der vorliegenden Arbeit, ermöglichen nun zum einen spezifische Aussagen bezüglich der MRSA-Situation an der UMM in den Jahren 2004-2008. Zum anderen werden durch den Vergleich mit dem KKM Rückschlüsse möglich, ob die MRSA-Diversität im Mainzer Raum klinikspezifisch ist oder sich auf einen größeren städtischen Rahmen bezieht.

#### **5.1.1 Eignung der Typisierungsmethoden**

Um genetische Verwandtschaften der Isolate untereinander ermitteln zu können, wurde zunächst das Verfahren der spa-Typisierung angewendet und im Anschluss daran für jedes Isolat eine PFGE durchgeführt. Da laut Witte et al [99] eine Typisierungsmethode verschiedenen Anforderungen genügen muss um ein aussagekräftiges und reproduzierbares Ergebnis zu liefern, wurden die angewandten Methoden auf ihre Tauglichkeit untersucht.

Mit 99,83 % Typisierbarkeit, 100 % reproduzierbaren Ergebnissen, stabilen Merkmalen und einer großen Vielfalt an Typen erschien die spa-Typisierung geeignet um im Falle eines Ausbruchsgeschehens ausreichend diskriminatorische Ergebnisse zu liefern. Doch es existierte mit t003 ein spa-Typ, welcher an beiden Kliniken über 70 % der untersuchten Speziespopulation ausmachte (siehe Tabelle 9). Am KKM ergab sich zudem auch für t032 mit 6 % ein zweiter spa-Typ, welcher die von WITTE *et al.* [99] gesetzte 5 % Grenze des häufigsten Typus einer getesteten Speziespopulation überstieg.

Die PFGE erreichte 100 % Typisierbarkeit, 100 % reproduzierbare Ergebnisse, stabile Merkmale und eine enorme Vielzahl an unterscheidbaren Gruppen. Doch es gab im gesamten Mainzer Raum insgesamt vier PFGE-Gruppen (drei an der UMM, vier am KKM), welche Gruppengrößen  $\geq 5$  % der untersuchten Speziespopulation aufwiesen (siehe Tabelle 14).

Nur für die UMM betrachtet war die Differenzierbarkeit der PFGE (32 Obergruppen mit 85 Untergruppen) im Vergleich zur spa-Typisierung (vier spa-CCs und 14 unabhängige Typen basierend auf 49 spa-Typen, siehe Tabelle 12), zwischen 56% (Obergruppen/spa-CCs) und 44 % (Untergruppen/spa-Typen) höher. Nach Anwendung der Kriterien von WITTE *et al.* [99] wäre die PFGE trotz höherer Diskriminationsfähigkeit als die spa-Typisierung eine noch ungeeignere Typisierungsmethode, weil noch mehr Gruppen der Untersuchungspopulation die 5 % Grenze überschritten. Diese Diskrepanz lässt an der Richtigkeit/Sinnhaftigkeit der 5 % Forderung zweifeln und erfordert zumindest eine wichtige Ergänzung bezüglich der Anwendbarkeit. Denn wenn eine Testpopulation in sich keine große Variabilität und zudem eine hoch klonale Struktur aufweist, so ist es wahrscheinlich auch mit einer „whole genome“ Sequenzierung und anschließender SNP-Analyse (englisch: single nucleotide polymorphism, Polymorphismus eines Nukleotides) unmöglich, die 5 % Forderung zu erfüllen. Die 5 % Regel kann daher nicht uneingeschränkt angewendet werden. Da es jedoch wichtig ist, dass eine Typisierungsmethode zuverlässig zwischen verschiedenen klonalen Linien und Subtypen unterscheidet, muss diese Fähigkeit anderweitig und vor allem unabhängig von lokal vorherrschenden Gegebenheiten getestet werden. Hierfür könnte von zentraler Stelle (z. B. dem RKI oder dem NRZ) eine Keimauswahl festgelegt werden, welche MRSA Isolate aus unterschiedlichen spa-Typen oder klonalen Komplexen enthält. Werden diese von einer Typisierungsmethode unterschieden, kann das Verfahren als geeignet für diesen Keim angesehen werden.

### 5.1.2 Auswertung der Typisierungsergebnisse

#### 5.1.2.1 spa-Typisierung

Mittels der spa-Typisierung wurden im Mainzer Raum insgesamt 64 unterschiedliche spa-Typen detektiert, wovon 49 an der UMM und 31 am KKM nachgewiesen wurden (siehe Tabelle A 2). Die Differenz ergibt sich durch die größere Untersuchungsmenge an der UMM, bedingt durch die Größe und den wesentlich höheren Patientendurchsatz dieser Klinik.

An beiden Kliniken zeigte sich, dass über 50 % aller nachgewiesenen spa-Typen lediglich einmalig detektiert wurden (siehe Tabelle 13). Diese große Anzahl sporadisch auftretender spa-Typen könnte durch die Nähe zum Frankfurter Flughafen bedingt sein, welcher einer der größten in Europa ist. Das tourismusbedingte verstärkte Aufkommen von Personen aus dem Ausland und somit auch potentiellen Trägern neuer in Deutschland nicht verbreiteter spa-

Typen, beeinflusst zwangsläufig den Eintrag dieser in die Rhein-Main-Region und somit auch in die regionalen Kliniken. Dass diese spa-Typen nicht unbedingt regionale Keime verdrängen, bzw. dass dieser Vorgang zumindest in der vorliegenden Arbeit während der bearbeiteten Untersuchungsperiode nicht beobachtet werden konnte, zeigte sich daran, dass die in beiden Kliniken am häufigsten aufgetretenen spa-Typen ( $\geq 1\%$  der Gesamtuntersuchungsmenge, siehe Tabelle 9) zum größten Teil in allen fünf Untersuchungsjahren nachweisbar waren (siehe Tabelle 10). Es konnte kein spa-Typ dokumentiert werden, welcher in einem Untersuchungsjahr plötzlich auftaucht und sich anschließend stark verbreitet. Vereinzelt waren Übertragungen von Müttern auf ihre Babys nachweisbar (t008 im Jahr 2006 und t024 im Jahr 2005), und auch ein kleiner Ausbruch von t032-MRSA im klinischen Bereich P2 im Jahr 2007 (siehe Tabelle A 3) konnte festgestellt werden. In allen drei Fällen handelte es sich jedoch nicht um neu eingeschleppte, bisher an der UMM nicht nachgewiesene Keime, ganz im Gegenteil gehörten diese spa-Typen zu den acht am häufigsten detektierten an der UMM (siehe Tabelle 9). Von diesen acht spa-Typen zählen t002, t003, t008 und t032 zu den deutschlandweit am häufigsten auftretenden Epidemiestämmen [5], welche auch pandemisch verbreitet sind (siehe Tabelle A 1 im Anhang). Bei den übrigen häufiger nachgewiesenen spa-Typen t014, t024, t045 und t1018 handelt es sich nicht um bekannte Epidemiestämme, aber bis auf t024 um phylogenetisch Verwandte von t003 aus dem großen klonalen Komplex CC5. Die Keim-Situation im Raum Mainz während der fünf Untersuchungsjahre zeigte ein Vorherrschen von spa-Typen aus einem klonalen Komplex, was auf eine optimale Anpassung an die lokalen Gegebenheiten und eine hohe Konkurrenzfähigkeit dieser Klone schließen lässt. Warum eine große Anzahl an MRSA-Erkrankungen von vergleichsweise wenigen, klonalen Typen verursacht wird konnte bisher nicht geklärt werden [127], vermutet wird die Ursache jedoch unter anderem in besonderen genetischen Eigenschaften dieser Keime [50].

Diese besonderen Eigenschaften müssen vor allen Dingen die Isolate des spa-Typs t003 besitzen, denn dieser dominierte in beiden Krankenhäusern mit über 70 % (siehe Tabelle 9) und dies über alle fünf Untersuchungsjahre hinweg (siehe Tabelle 10). Bei diesem Keim handelt es sich laut Ridom SpaServer um einen sogenannten Rhein-Hessen-Subklon, einen Abkömmling des Rhein-Hessen-Prototyps t002. Da erst seit 2006 vom NRZ die spa-Typisierung eingeführt wurde und 2007 das erste Mal der Rheinhessen-Typ nicht nur als t002 bezeichnet, sondern auch in t003 unterschieden werden konnte, liegen für frühere Zeiträume keine genauen Daten zur spa-Typenverteilung an deutschen Krankenhäusern vor. Ab 2007

## *Diskussion*

war t003 der zweithäufigste Keim nach t032 unter den eingesandten Isolaten [5]. t003, welcher früher vor allem im Westen und Südwesten der Republik verbreitet war, ist mittlerweile im gesamten Bundesgebiet nachweisbar [4] und außerdem weltweit auf dem Vormarsch wie die Nachweise des Ridom SpaServer zeigen (siehe Tabelle A 1). Anhand der Daten dieser Dissertation kann belegt werden, dass der spa-Typ t003 schon vor 2004 zum dominierenden Keim an der UMM avancierte und seitdem mit einem konstant starken Vorkommen in allen fünf Untersuchungsjahren vorherrschend war (siehe Abbildung 5). STROMMINGER *et al.* [7] detektierten diesen Keim in Deutschland erstmalig 2001, was bedeutet, dass ungefähr zu diesem Zeitpunkt die Ausbreitung von t003 begonnen haben muss. Ein Vorkommen von über 70 % an einer Klinik und dies über fünf Jahre hinweg ist jedoch, nach Wissen der Autorin, bisher noch nicht publiziert worden und scheint deutschlandweit noch nie in diesem Ausmaß in Erscheinung getreten zu sein. So konnte beispielsweise in einer ähnlichen Studie über sechs Jahre von FENNER *et al.* [128] kein vorherrschender spa-Typ gefunden werden und die neun häufigsten spa-Typen machten zusammen lediglich 49,5 % aller untersuchten Isolate aus.

Die Dominanz von t003 im Mainzer Raum zeigt, dass dieser Keim bestens an die vorherrschenden lokalen Bedingungen angepasst und dass diese Anpassung nicht klinikbezogen ist. Wäre t003 nicht im selben Ausmaß an den beiden größten Krankenhäusern von Mainz nachgewiesen worden, müsste ein Ausbruchsgeschehen mit ungeahnten Ausmaßen angenommen werden. Die Daten lassen jedoch eher die Vermutung zu, dass t003 während des Untersuchungszeitraums in der Bevölkerung kursierte und der Großteil der MRSA besiedelten Patienten schon mit diesem Keim in die Kliniken eingeliefert wurde. Eine aktuelle, repräsentative Querschnitt-Studie innerhalb der Mainzer Bevölkerung könnte Aufschluss darüber geben, ob diese These stimmt und in welchem Ausmaß t003 sich auch außerhalb des Klinikums angesiedelt hat. Da die Isolate und somit die Daten der vorliegenden Arbeit zeitlich gesehen schon etwas älter sind, müsste parallel zu einer Studie in der Bevölkerung auch der aktuelle Stand in den Kliniken untersucht werden, da nicht per se davon ausgegangen werden kann, dass die aktuelle Situation ähnlich der des Untersuchungszeitraums ist. Dieser Versuchsaufbau würde gleichzeitig einen Vergleich bezüglich der vorherrschenden spa-Typen beider Zeiträume ermöglichen und könnte wertvolle Einblicke in die Langzeit-Populationsdynamik von MRSA einer Großstadt liefern.

### **5.1.2.2 PFGE**

Da die spa-Typisierung sowohl an der UMM als auch am KKM zu über 70 % den vorherrschenden spa-Typ t003 ergab, wurde vermutet, dass eine Typisierungsmethode, welche sich lediglich auf einen Genlocus beschränkt, im Falle eines lokal vorherrschenden Keims, eine zu geringe Auflösung liefert. Daher wurden alle 1114 MRSA-Isolate einem weiteren Typisierungsverfahren unterzogen, bei welchem das ganze Bakteriengenom mittels Restriktionsenzymen geschnitten und somit eine detailliertere Betrachtung angestrebt wurde. Die PFGE sollte eine weitere Differenzierung, insbesondere von MRSA des spa-Typus t003, ermöglichen.

Die Schnittmuster aller 1114 Keime konnten anhand einer Clusteranalyse in insgesamt 99 Gruppen (I1-XXXVI2) unterschieden werden, von denen 85 an der UMM und 49 am KKM nachweisbar waren (siehe Tabelle A 5). Die Zahl der nur einmalig nachgewiesenen Keime/Muster betrug ähnlich wie bei der spa-Typisierung ca. 50 % an beiden Kliniken (siehe Tabelle 18). Diese Übereinstimmung ergab sich jedoch nicht daraus, dass für jeden nur einmalig nachgewiesenen spa-Typ auch ein einmaliges PFGE-Muster vorhanden war. Dies konnte zwar auch beobachtet werden (z. B. t018 in XXXIII1, t078 in V1 und t091 in XII4), aber es kam ebenfalls vor, dass diese spa-Typen zusammen mit anderen in eine PFGE-Gruppe geclustert wurden (z. B. t022 und t032 in XXX2, t027 mit 15 weiteren spa-Typen in VII1) oder auch, dass vereinzelt Isolate eines häufigen spa-Typs ein einmaliges PFGE-Muster aufwiesen (z. B. t001 in XIII2 und XIV2, t003 XII1, XII2, t008 in XV2 und XVIII3). Daraus kann abgeleitet werden, dass unterschiedliche spa-Typen nicht immer unterschiedliche MRSA bedingen, sondern ganz im Gegenteil, dass laut PFGE-Muster phylogenetisch gleiche MRSA unterschiedliche spa-Typen aufweisen können. Dies zeigt sich deutlicher, wenn die Zusammensetzung der am häufigsten nachgewiesenen PFGE-Gruppen ( $\geq 1\%$  der Gesamtuntersuchungsmenge) betrachtet wird (siehe Tabelle 14), denn neun der zehn häufigsten PFGE-Gruppen an der UMM und zehn von dreizehn am KKM gehörten der PFGE-Obergruppe VI an. Diese Obergruppe beinhaltet die Muster aller lokalen Isolate des spa-Typs t003. Neben t003 weisen jedoch auch andere spa-Typen ein identisches Schnittmuster auf, wie die 16 spa-Typen in der Gruppe VII1 eindrucksvoll belegen. Somit können Isolate ein und desselben spa-Typs, aber auch unterschiedlicher spa-Typen anhand ihres PFGE-Musters phylogenetisch korrekt eingeordnet werden.

Die wichtigste und durch die PFGE angestrebte Differenzierung sollte für t003 erzielt werden, da dieser mit über 70 % der nachgewiesenen spa-Typen den Raum Mainz dominiert. Anhand

der PFGE konnte für t003 eine Unterscheidung in 34 unterschiedliche Muster/PFGE-Gruppen erfolgen, was eine erstaunlich große genetische Vielfalt für diesen MRSA belegt. Außerdem gehörten neun dieser PFGE-Gruppen zu den am häufigsten nachgewiesenen an der UMM ( $\geq 1\%$  der Gesamtuntersuchungsmenge, siehe Tabelle 14) und konnten bis auf VI4, VII1 und VI27 während des gesamten Untersuchungszeitraums nachgewiesen werden (siehe Tabelle 15). Das Fehlen von VI4, VII1 und VI27 in ein bis zwei Jahren könnte durch die geringe Isolatzahl  $\leq 10$  in diesen Gruppen bedingt sein.

Die Vielfalt und auch die andauernde zeitliche Persistenz so vieler t003-PFGE-Gruppen ist wahrscheinlich der Grund für den lokalen Erfolg dieses spa-Typs. Durch die große Anzahl immer neuer Subtypen, welche sich in den nur sporadisch auftretenden PFGE-Gruppen widerspiegelt, kann t003 vermutlich besser auf Veränderungen reagieren als andere MRSA. Sehr wahrscheinlich herrschten an der UMM nicht immer genau diese neun t003-PFGE-Gruppen vor, die im Untersuchungszeitraum dominierten. Es wird einen Zeitpunkt gegeben haben, an welchem ein neuer Klon so angepasst war, dass er sich ausbreiten konnte. Ob er dabei einen anderen MRSA verdrängte, oder einfach eine Nische besetzte kann nicht untersucht werden, da die älteren Keime der Stammsammlung aus vorherigen Jahren durch Probleme bei der Lagerung nicht mehr in vollem Umfang zur Verfügung stehen. Da t003 von STROMMINGER *et al.* [7] im Jahr 2001 das erste Mal in Deutschland dokumentiert wurde, wäre ein Untersuchungszeitraum von 2000 bis 2004 hochinteressant, da dann höchstwahrscheinlich sowohl das erstmalige Auftreten, als auch die Entwicklung der lokalen Populationsstruktur von Beginn an analysiert werden könnten. Da die Stammsammlung, jedoch nur bis 2002 zurückreicht kann eine derartige Untersuchung leider nicht durchgeführt werden.

### 5.1.2.3 Zeitliche Dynamik

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zum zeitlichen Auftreten von MRSA zeigen eine Abweichung im Vergleich zu VRE. Über fast den gleichen Untersuchungszeitraum (2004-2009) untersuchte Böhme [129] mittels PFGE unter anderem das Vorkommen und die Varianz von VRE an der UMM. Sie kam zu dem Ergebnis, dass VRE-PFGE-Gruppen durchschnittlich zwischen 1-3 Jahren nachweisbar waren und es ständig zu Veränderungen des PFGE-Musters kommt, wobei die neuen Muster eng mit den vorher nachgewiesenen verwandt waren. Die VRE an der UMM zeigten demnach eine Tendenz zur rasanten Weiterentwicklung und Unbeständigkeit. MRSA hingegen wiesen zwar ebenfalls einen hohen

Grad an Diversität und Entwicklung auf, doch keine schnelle Verdrängung einmal etablierter Keime. Dieser Prozess scheint sehr langsam zu erfolgen, wie die Daten von STROMMINGER *et al.* [7] belegen. Aus ihrer Studie wird ersichtlich, dass ein Untersuchungszeitraum von fünf Jahren durchaus ausreichend ist, um Veränderungen in der Populationsstruktur dokumentieren zu können, doch wenn dieser Zeitraum in einer stabilen Phase der Konstanz liegt, kann kein Wandel festgestellt werden. Im vorliegenden Fall wäre höchstwahrscheinlich ab dem Jahr 2000 eine tiefgreifende Veränderung bezüglich der vorherrschenden spa-Typen im Mainzer Raum sichtbar gewesen, denn 2001 berichteten STROMMINGER *et al.* [7] erstmals vom Auftreten des t003 in Deutschland.

Insgesamt lassen die lokalen Beobachtungen zu spa-Typen und PFGE-Gruppen den Schluss zu, dass falls einmal eine Veränderung des vorherrschenden MRSA-Typus erfolgen sollte, diese (wie bei VRE) eher durch eine Varianz innerhalb eines lokal dominierenden spa-Typus bedingt wird, als durch die Verdrängung durch einen neuen nicht lokal-verwandten spa-Typ. Denn kein spa-Typ, egal ob Epidemiestamm oder sporadischer MRSA, konnte während der Untersuchungsperiode sein Vorkommen, weder sukzessive noch abrupt, ausweiten (siehe Abbildung 5). t003 behauptete seine Vormachtstellung trotz anhaltender Konkurrenz durch sieben weitere stark vertretene spa-Typen (siehe Tabelle 9) und hoher Variabilität durch den ständigen Eintrag neuer spa-Typen. Dieser Keim ist hochdivers, äußerst anpassungsfähig und extrem konkurrenzfähig.

### 5.1.2.4 Kritische Betrachtung der mittels BURP-Clusterung gebildeten spa-CCs

Die BURP-Clusterung sollte eine phylogenetische Auswertung basierend auf spa-Typen ermöglichen, wobei die Repeats der einzelnen spa-Typen mittels des BURP-Algorithmus verglichen und ausgewertet wurden. Als Ergebnis wurden sogenannte spa-CCs gebildet, in welche alle spa-Typen mit ähnlichem Repeatmuster geclustert wurden.

Die BURP-Clusterung der vorliegenden Arbeit ergab insgesamt vier spa-CCs (spa-CC002, spa-CC003, spa-CC005 und spa-CC024) und 14 unabhängige Typen (siehe Tabelle 12). In Tabelle A 6 wurden die Repeatsequenzen und wahrscheinlichsten genetischen Events für jeden spa-Typ eines spa-CCs dargestellt. Die verwandtschaftlichen Beziehungen der spa-CCs und unabhängigen Typen wurden in einem Phylogramm veranschaulicht (siehe Abbildung 7). Die Zuordnungen der spa-CCs sollten mit den Gruppierungen der PFGE übereinstimmen, falls anhand der Repeatsequenzvariationen tatsächlich zuverlässige phylogenetische Aussagen getroffen werden können.



## *Diskussion*

Zum spa-CC002 wurden die spa-Typen t001, t002 und t311 geclustert. Die PFGE-Muster dieser spa-Typen sollten demnach einander ähnlich sein und die Isolate zumindest der gleichen PFGE-Obergruppe angehören. Für t001 ergaben sich die PFGE-Obergruppen XIII, XVI und XVII, wobei in XVII auch noch ein t003 aus dem spa-CC003 und der unabhängige Typ t608 geclustert wurden (siehe Tabelle A 7). Die Isolate des spa-Typs t002 wurden in sechs verschiedene Untergruppen der Obergruppe VI geclustert, welche vornehmlich Schnittmuster von lokalen t003 enthielt. Der spa-Typ t311 wurde der PFGE-Obergruppe XI zugeordnet und mit keinem weiteren spa-Typ assoziiert, daher stellte er einen sporadischen, mit keinem weiteren MRSA verwandten Keim dar. Somit zeigten die Isolate der drei spa-Typen des spa-CC002 in der PFGE zumindest untereinander keine phylogenetischen Ähnlichkeiten, aber t001 und t002 mit t003 aus dem spa-CC003 und t001 außerdem mit dem unabhängigen Typ t608. Der spa-CC002 wurde demnach komplett falsch geclustert. Aus diesen Beobachtungen ist zu schließen, dass ähnliche Repeatsequenzen nicht gleichzusetzen sind, mit tatsächlich bestehender phylogenetischer Verwandtschaft.

In den spa-CC024 wurden 4 spa-Typen (t008, t024, t190 und t305) aus sieben-PFGE Obergruppen geclustert (siehe Tabelle A 7). Für t008 und t024 konnten Übereinstimmungen bezüglich der Gruppen XV und XX festgestellt werden. Alle t024 konnten dem PFGE-Muster nach mit t008 aus diesen beiden Gruppen assoziiert werden. Der als hochdivers geltende t008 wurde außerdem noch in den drei Obergruppen XVIII, XXII und XXIII detektiert, was einen Beleg für die Heterogenität dieses Keims darstellt. Die beiden spa-Typen t190 und t305 wurden jeweils allein in die Obergruppen XXI und XXXIII geclustert, wodurch sie weder untereinander noch mit den anderen Isolaten des spa-CC024 verwandt sind.

Der spa-CC005 enthielt die sechs spa-Typen: t005, t022, t032, t474, t852 und t1378 welche alle in die die Obergruppe XXX geclustert wurden. Lediglich für ein Isolat des spa-Typs t032 wurde ein weiteres PFGE-Muster (XXXI) detektiert. Für den spa-CC005 bedeutet dies, dass die Zuordnungen anhand der Repeatabfolge bis auf eine Abweichung stimmten. Doch gerade dieser Nachweis eines spa-Typs in mehreren Obergruppen deutet auf eine gravierende Schwachstelle der BURP-Clusterung hin.

Der größte Komplex war spa-CC003 mit 22 spa-Typen, aus acht PFGE-Obergruppen. Allein t003 war in sieben PFGE-Obergruppen nachweisbar, was bedeutet, dass gleiche spa-Typen nicht immer für MRSA mit dem gleichen genetischen Hintergrund stehen. Alle 22 spa-Typen, außer t014 und t535 konnten mit t003 aus der Obergruppe VI assoziiert werden, wodurch für diese spa-Typen die enge Verwandtschaft zu t003 und auch die richtige Zuordnung zu spa-

## Diskussion

CC003 bewiesen wurde. t014 gilt ebenfalls als korrekt eingeordnet, da die Verwandtschaft zu t003, allerdings aus der Obergruppe X, belegt werden konnte. Für t535 konnte jedoch keine Verbindung zu t003 oder einem anderen spa-Typ aus dem spa-CC003 hergestellt werden, da dieser Keim allein in die Obergruppe III geclustert wurde.

Bezüglich der unabhängigen Typen, welche keinem spa-CC zugeordnet wurden, stimmten die Ergebnisse mit denen der PFGE größtenteils überein. Jedoch fünf (t037, t091, t608, t4484 und t11183) von 14 unabhängigen Typen konnten anhand der PFGE auch mit anderen spa-Typen in eine Obergruppe geclustert werden und galten somit als verwandt mit den jeweiligen spa-Typen. Es kann also vorkommen, dass spa-Typen, welche nur noch entfernt Ähnlichkeit miteinander aufweisen, wie z. B. t003 mit der Repeatabfolge: 26-17-20-17-12-17-17-16 und t4484 mit der Repeatabfolge: 26-23-17-17-20-17-12-17-34 (siehe Tabelle A 6), sogar in die selbe PFGE-Untergruppe (VI2, siehe Tabelle A 7) geclustert werden können und es sich somit nach den Kriterien von TENOVER *et al.* [78] um gleiche MRSA handelt.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass bei MRSA mit gleichen spa-Typen nicht automatisch derselbe Keim vorliegt. Selbst spa-Typen mit ähnlichem Repeatmuster, welche theoretisch miteinander verwandt sein könnten, müssen phylogenetisch nicht die gleiche Abstammung besitzen. Umgekehrt gilt, dass spa-Typen, welche nur sehr entfernte Ähnlichkeiten aufweisen, in der PFGE als genetisch gleich oder ähnlich dargestellt werden können.

Die Diskrepanzen zwischen spa-CCs und PFGE führten zwangsläufig dazu, dass auch das mit Splits Tree 4 erstellte Phylogramm (siehe Abbildung 7) keine validen Cluster enthielt. Zwar wurden im Phylogramm die unabhängigen Typen teilweise bestimmten spa-CCs zugeordnet, was jedoch auch nicht immer stimmte. So wurde beispielsweise t608 als verwandt mit dem spa-CC005 dargestellt, während laut PFGE die Isolate dieses spa-Typs teilweise dem spa-CC003 zugeordnet werden müssen und zum Teil auch eine eigene Obergruppe bilden.

Die Ergebnisse belegen, dass die spa-Sequenz zu wenige Informationen für eine valide Verwandtschaftsanalyse von Keimen liefert, für welche teilweise konvergente Evolution und Homoplasie nachgewiesen wurden. So zeigten aktuelle genomweite SNP-Analysen für MRSA des Sequenztyps ST239 überwiegend Übereinstimmungen mit den Zuordnungen von spa-Typen und PFGE-Mustern. Es ergab sich nur ein Hinweis auf Homoplasie und konvergente Evolution [79]. Der zugehörige, von HARRIS *et al.* entwickelte, phylogenetische Baum zeigte sowohl Übereinstimmungen mit den geographischen Daten, als auch Belege für interkontinentale Verbreitung. Dies bedeutet, dass alle Isolate eines Landes ein Cluster bildeten, aber auch, dass Subtypen in andere Gebiete der Welt eingetragen wurden und sich

dort ausbreiteten. Die Forschungen von NÜBEL *et al.* [130] zur Verbreitung des Sequenztyp ST5 hingegen fanden deutliche Anzeichen von wiederholter konvergenter Evolution. Sie konnten ebenfalls einen starken phylogeographischen Zusammenhang feststellen, aber keine Hinweise auf eine interkontinentale Verbreitung, da sich Isolate mit gleichen spa-Typen aus unterschiedlichen Ländern deutlich im SNP-Profil unterschieden. Sie schließen aus ihren Daten, dass MRSA mehrfach an voneinander unabhängigen Orten entstanden sind und die geographische Ausbreitung limitiert ist. Da diese beiden Publikationen bisher die einzigen zur Thematik sind, werden erst zukünftige hochauflösende phylogenetische Rekonstruktionen weiterer klonaler MRSA Linien die tatsächlich ablaufenden Prozesse darlegen können. Eine Erklärung für die Diskrepanz beider Publikationen versuchten HARRIS *et al.* [79] mit dem Hinweis auf die jüngere Entstehungsgeschichte von ST239, welche eventuell noch nicht ausreichte um mehr spa-Typ-Homoplasien auszubilden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen beide Publikationen. So konnte die interkontinentale Verbreitung einzelner MRSA durch die caMRSA der spa-Typen t008, t044 und t019 bestätigt werden, da die PFGE-Muster mit denen der Publikationen aus anderen Ländern übereinstimmen und somit eine Einschleppung angenommen werden muss. Die phylogeographische Übereinstimmung kann anhand der Obergruppe VI belegt werden, da alle t003, welche zur lokalen Kohorte gehörten durch ähnliche PFGE-Schnittmuster gekennzeichnet sind und somit in diese Obergruppe geclustert wurden. Die t003 aus den sechs anderen Obergruppen (VII, VIII, X, XII, XVII und XXV, siehe Tabelle A 7) gelten aufgrund bestehender genetischer Unterschiede als nicht miteinander verwandt und stehen damit in keinem Zusammenhang zur lokalen Kohorte. Bei diesen MRSA müsste es sich aufgrund der von den Lokalkeimen abweichenden genetischen Struktur um eine konvergente Evolution des gleichen spa-Typs in unterschiedlichen MRSA handeln. Die Schlussfolgerung aus den Daten der vorliegenden Arbeit ist daher, dass MRSA scheinbar bevorzugt lokale Cluster bilden, aber auch, dass konvergente Evolution und interkontinentale Verbreitung, beispielsweise durch Tourismus, möglich sind. Doch aus der Möglichkeit der Verbreitung resultiert nicht zwangsläufig auch der Erfolg des betreffenden Keims. Jeder importierte Keim muss sich mit den lokal adaptierten messen und hat nur in den seltensten Fällen Aussicht auf eine Ausbreitung oder Nischenbesetzung. Dies könnte ursächlich dafür sein, warum importierte MRSA seltener nachgewiesen werden und in der Studie von NÜBEL *et al.* [130] keine entsprechenden Nachweise vorhanden waren, vor allem wenn sporadische, neue MRSA nur als Besiedlungskeime auftreten.

Basierend auf den in dieser Arbeit belegten Diskrepanzen von spa-Typen und PFGE-Gruppen und der somit bestätigten Theorie der konvergenten Entwicklung muss von einer BURP-Clusterung abgeraten werden. Die von MELLMANN *et al.* [131] in ihrer Arbeit mit 66 spa-Typen erreichte 94,9 % Konkordanz von BURP und PFGE-Clustern ist mit der Auswahl/Anzahl der Isolate zu erklären, denn in die Studie wurden 110 MSSA aus dem Nottingham Health District einbezogen. Die zwei spa-Typen t008 und t078 waren mit je acht Nachweisen am häufigsten vertreten. Demzufolge wurde die überwiegende Mehrzahl der spa-Typen lediglich einmal nachgewiesen, was automatisch zu einer Reduktion der Fehlerquote und einem Anstieg der Konkordanz führt. Denn würden Isolate eines spa-Typ aus unterschiedlichsten Regionen weltweit verglichen werden, z. B. ein t003 aus allen Ländern in denen er bisher dokumentiert wurde, so wären anhand der BURP-Clusterung alle diese spa-Typen gleich, aber die PFGE würde starke Variationen nachweisen können. Dies wurde von NÜBEL *et al.* [130] bestätigt, denn sie belegten, dass der Nachweis ein und desselben spa-Typs in unterschiedlichen Ländern nicht bedeutet, dass es sich um den gleichen Klon handelt. Letztendlich zeigen die Ergebnisse, dass erst die zukünftigen Erkenntnisse basierend auf SNP-Analysen von „whole genome“ Sequenzierungen die notwendigen Einblicke für die Erstellung zuverlässiger phylogenetischer Stammbäume, die Verbreitung pandemischer Klone und den Anteil konvergenter Evolution liefern werden.

### 5.1.3 Anwendbarkeit von spa-Typisierung und PFGE bei Ausbruchsgeschehen

Da an der UMM der spa-Typ t003 für 74 % aller diagnostizierten MRSA verantwortlich ist (siehe Tabelle 9), kann die Interpretation von Häufungen dieses spa-Typs problematisch werden. Basierend auf der Auswertung der in dieser Arbeit präsentierten Daten, wäre es empfehlenswert, ein MRSA-Eingangsscreening für alle Patienten, nach Möglichkeit noch vor der stationären Aufnahme durchzuführen. Durch ein derartiges Verfahren könnte festgestellt werden, welche Personen schon vor dem Klinikaufenthalt eine Besiedlung aufwiesen und nosokomiale Übertragungen ausgeschlossen werden.

Aufgrund der vorherrschenden Dominanz von t003 und phylogenetisch verwandten MRSA wäre eine sofortige Typisierung der MRSA zwar aus Forschersicht durchaus interessant, doch für die Klinik würde sich der Aufwand und vor allem des investierte Geld höchstwahrscheinlich nicht rechnen, obwohl sich aus solch einem Vorgehen mit Sicherheit viele Möglichkeiten und Vorteile ergeben würden.

## *Diskussion*

In der vorliegenden Arbeit konnten, basierend auf einer Auswertung der jährlichen prozentualen Schwankungen der größten spa-Typengruppen (siehe Abbildung 5), einige Auffälligkeiten festgestellt werden (siehe Tabelle A 3). Im Jahr 2005 ergab sich ein vermehrter Nachweis von t024 im klinischen Bereich G. Dieser konnte als Übertragung von einer Mutter auf ihre Drillinge geklärt werden. 2006 wurden zwei Isolate des spa-Typs t008 ebenfalls im klinischen Bereich G diagnostiziert, wobei es sich auch um eine Übertragung von einer Mutter auf ihr Kind handelte. Der einzige Ausbruch ereignete sich im Jahr 2007 durch eine Anhäufung mit Isolaten des spa-Typs t032 im klinischen Bereich P2. Alle diese Auffälligkeiten wurden auch ohne die Überwachung durch eine MRSA-Typisierung erkannt. Dies funktionierte, indem jeder MRSA-Nachweis aus einem klinischen Bereich registriert wurde. Bei mehrmaligen Nachweisen innerhalb kurzer Zeit wurden entsprechende Hygienemaßnahmen eingeleitet und die entsprechenden Keime per PFGE typisiert um zu erfahren, ob es sich um denselben oder unterschiedliche Keime handelte. Die PFGE-Muster der beteiligten Isolate stimmten in allen drei Fällen überein, so dass die Übertragungen bzw. der Ausbruch als erwiesen galten.

Bei der Durchführung eines prinzipiellen MRSA-Screenings samt spa-Typisierung für jeden Patienten, wäre der Keimstatus schon bei oder kurz nach Aufnahme bekannt. Sollte es wie in den angeführten Beispielen auf einer Station zu einem gehäuften Nachweis kommen, so wäre aus den im Vorfeld gesammelten Daten ersichtlich, wer schon mit welchem MRSA-spa-Typ kolonisiert war, wer erst im Laufe des Klinikaufenthaltes kolonisiert oder infiziert wurde und die Keime welches Patienten für die neuen Nachweise verantwortlich sein könnten. Im Fall der Mutter-Kind-Übertragungen ist die Sachlage zwar eindeutig, doch für den Ausbruch mit t032 konnte der Ursprung nicht geklärt werden, dies wäre möglich gewesen, wenn es ein prinzipielles Eingangsscreening bei Aufnahme in die Klinik gegeben hätte.

Da t003 der vorherrschende spa-Typ ist und es hypothetisch auch zu Ausbrüchen oder Häufungen mit t003 in einem klinischen Bereich kommen kann, würde ein generelles Eingangsscreening die Interpretation der Situation erleichtern. So könnte festgestellt werden, welche Patienten den Keim nicht erst nosokomial übertragen bekommen haben. Und da alle Erstisolate eingefroren werden, könnte auch nachvollzogen werden, welcher PFGE-Gruppe die Isolate der schon bekannten MRSA-Träger und der Neunachweise angehören. Da diese Daten schon vor einem potentiellen Ausbruch gesammelt werden würden, besteht die Möglichkeit, die Dynamik der Weiterentwicklung während eines Ausbruchs nachvollziehen zu können. Denn wenn lange vor einem Ausbruch bekannt ist, dass zwei Patienten bei

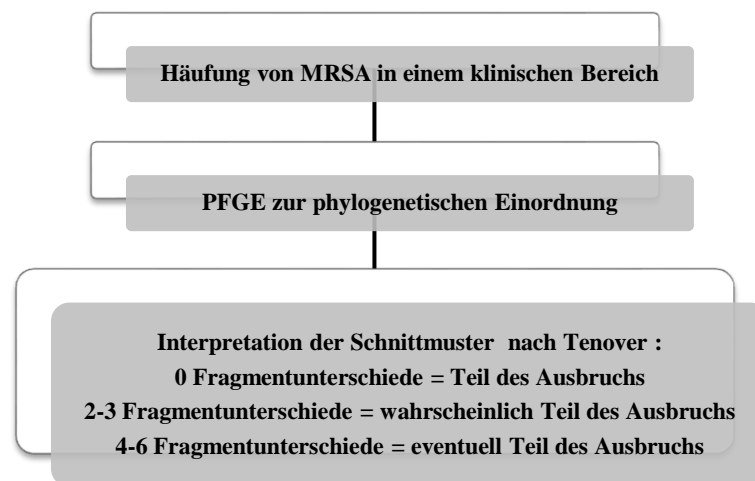
## Diskussion

Aufnahme zwar t003 besiedelt sind, doch der eine mit einem t003 aus der PFGE-Gruppe VII und der andere mit einem aus der Gruppe VI10, so können die Kriterien von TENOVER *et al.* [78], welche in einem Ausbruchsfall Anwendung finden sollten etwas differenzierter betrachtet werden. So müssten die beiden Keime aus der gleichen PFGE-Obergruppe aber unterschiedlichen Untergruppen nicht beide als potentieller Ausbruchskeim betrachtet werden. Je nachdem, welches PFGE-Muster/welche -Gruppe sich für den neu nachgewiesenen MRSA ergibt, kann bei direkter Übereinstimmung mit VII oder VI10 der Ursprungskeim festgestellt werden, oder bei einer abweichenden PFGE-Gruppe wie beispielsweise VI5 anhand eines Vergleichs mit den potentiellen Ausgangsmustern eine tendenzielle Zuordnung getroffen werden. Diese muss jedoch nicht zwangsläufig richtig bzw. überhaupt möglich sein, da sich die Keime der Obergruppe VI untereinander sehr ähnlich sind.

Sollte ein MRSA-Screening erst bei einem Verdacht auf eine Ausbreitung erfolgen, und für die beteiligten Patienten ist dies der erstmalige Nachweis, so wird im Fall von t003 assoziierten MRSA die Auswertung schwierig bis unmöglich. Prinzipiell muss ein vermuteter Ausbruch zunächst durch die Analyse der beteiligten Isolate bestätigt werden. Dabei sollten Abstriche aller möglicherweise beteiligten Personen, der patientennahen Umgebung und von assoziierbaren Medizinprodukten einbezogen werden. Das grundlegende Problem dabei ist, dass ohne generelles Eingangsscreening nicht zwischen mitgebrachten und nosokomial erworbenen MRSA unterschieden werden kann. Hinzu kommt, dass aufgrund der hohen Verbreitungsrate klonaler t003-Typen auch Isolate zu einem Ausbruchsgeschehen gerechnet werden würden, welche eigentlich nicht damit assoziiert sind. Die Grenze zwischen "zum Ausbruch zugehörig oder nicht" kann nicht gezogen werden, da nach Anwendung der Kriterien von TENOVER *et al.* [78] alle 25 Untergruppen aus der Obergruppe VI potentiell mit dem Ausbruchsgeschehen assoziiert sind. Dies bedeutet auch, dass außer t003 noch 25 weitere spa-Typen, welche ebenfalls in die Obergruppe VI geclustert wurden, nicht als unbeteiligt gelten können. TENOVER *et al.* [78] begründen dieses Vorgehen damit, dass epidemiologisch verbundene Isolate, die beispielsweise während eines Ausbruchs gesammelt werden, auch genetisch verwandt sein sollten, und somit als ein Stamm angesehen werden. Weiterhin wird angenommen, dass Isolate eines Ausbruchstammes die aktuellsten Nachkommen eines sporadischen oder verbreiteten Vorgängers sind. Diese Isolate sollten ähnliche oder gleiche Genotypen aufweisen, während nicht zugehörige Keime abweichende Muster zeigen. Wenn der MRSA-Status eines jeden Patienten aber schon vor dem Ausbruch

bekannt ist und die jeweiligen Keime typisiert werden können, so ist es theoretisch möglich, einige der MRSA als nicht ausbruchsassoziiert zu identifizieren, bzw. sogar die Quelle und Übertragungswege ausfindig zu machen. Theoretisch daher, weil allein in die PFGE-Obergruppe VI schon 83 % aller MRSA an der UMM geclustert wurden, zwar besteht diese aus sehr vielen Untergruppen, doch der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ist teilweise minimal. Die Dominanz dieser hoch klonalen Struktur ermöglicht demnach nur bei Häufungen von nicht mit t003 aus der Obergruppe VI phylogenetisch verwandten MRSA eine eindeutige Aussage ob ein Ausbruch angenommen werden muss oder nicht.

Da die Einführung eines generellen Eingangsscreenings zumindest aktuell aus Gründen der Kosten-Nutzen-Relation an der UMM nicht praktikabel ist, empfiehlt sich bei MRSA-Häufungen das in Abbildung 19 dargestellte Arbeits- und Interpretationsschema zur Differenzierung von ausbruchsassoziierten MRSA.



**Abbildung 19** Arbeits- und Interpretationsschema bei Häufungen von MRSA in einem klinischen Bereich ohne prinzipielles MRSA-Eingangsscreening.

#### **5.1.4 Einfluss der spa-Typ-Repeatlänge auf das epidemische Potential und die Virulenz**

FRÉNAVY *et al.* [11] stellten die Hypothese auf, dass die Anzahl der Repeats eines spa-Typs mit dem epidemischen Potential des Stammes korreliert. Ihre Studie zeigt, dass 24 von 33 getesteten epidemischen MRSA-Stämmen  $\geq 8$  Repeats besitzen und 10 von 14 nicht epidemischen MRSA  $\leq 7$  Repeats aufweisen. WALKER *et al.* [74] bestätigten die Ergebnisse in einer separaten Studie.

## Diskussion

Für ganz Deutschland wurden 2007 vom RKI [4] die spa-Typen t051, t009, t001, t004, t022, t032 und t002 als Epidemiestämme ausgegeben. Diese Stämme weisen alle zwischen 9 und 16 Repeats auf. Weiterhin besitzen die im gesamten Mainzer Raum häufiger vorkommenden spa-Typen: t002, t003, t008, t014, t032, t045 und t1018 (welche  $\geq 1\%$  im gesamten Mainzer Raum vorkommen) mit Ausnahme von t045 eine Repeatzahl zwischen 8 und 16 (siehe Tabelle A 4). Somit wird die These von FRÉNEY *et al.* [11] zunächst unterstützt. Bei der Betrachtung aller, in der vorliegenden Arbeit gefundenen spa-Typen zeigt sich jedoch, dass 39 (61 %) der 64 im Mainzer Raum gefundenen spa-Typen eine Repeatanzahl  $\geq 8$  aufweisen (siehe Tabelle A 4). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass prinzipiell mehr Stämme mit einer langen X-Region existieren und daher auch die Wahrscheinlichkeit größer ist, dass ein Epidemiestamm eine lange Repeatregion aufweist. Diese Annahme korreliert mit den Ergebnissen von NASHEV *et al.* [132], welche postulieren, dass 95 % von 20 untersuchten MRSA-Stämmen aus Nasenabstrichen Repeatregionen  $\geq 8$  besitzen. KURLENDÁ *et al.* [133] konnten von 94 MRSA keinen Stamm mit weniger als 7 Repeats nachweisen. Im Raum Mainz betrug die Anzahl von X-Regionen  $\leq 7$  39 %. Prozentual stellt dies eine deutliche Abweichung von den bisher postulierten Daten dar, eine Tendenz zur längeren X-Region ist jedoch unverkennbar. Abweichend von den angeführten Publikationen liegt dieser Arbeit mit 1114 MRSA-Isolaten eine große lokale Untersuchungsmenge zu Grunde. Außerdem besitzen die Mainzer Kliniken ein sehr großes Einzugsgebiet mit einem hohen Anteil multikultureller Patienten, womit es nicht ungewöhnlich ist, dass die vorgefundenen MRSA eine größere Vielfalt widerspiegeln. Auch die größere Anzahl von spa-Typen mit einer X-Region  $\leq 7$  könnte daraus resultieren.

Die vorliegenden Daten lassen die Vermutung zu, dass eine verlängerte X-Region allgemein einen Selektionsvorteil bezüglich verbesserter Wirtsbesiedlung darstellt und daher in der Mehrzahl der MRSA und somit auch der Epidemiestämme vorhanden ist. Protein A trägt neben Fibronectin, Fibrinogen und anderen extrazellulären Adhäsinen zur Bildung des Biofilms bei, mittels welchem das Bakterium in der Lage ist Polymeroberflächen und eukaryotisches Gewebe zu besiedeln [134]. Doch Untersuchungen zeigten, dass hinsichtlich der beteiligten Adhäsine und ihrer Menge große innerartliche Unterschiede bestehen, welche keinen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit der Organismen haben [83; 135]. Ob Protein A und im speziellen der Länge der Repeatregion tatsächlich eine besondere Rolle bei der Besiedlung zukommt, kann daher in dieser Arbeit nicht geklärt werden.



## Diskussion

FRÉNEY *et al.* [11] postulierten ebenfalls eine erhöhte Virulenz von Keimen mit einer Repeatregion  $\geq 8$ , denn viele Wiederholungen in der X-Region resultieren in einer längeren Protein A-Domäne, welche besser an das Fc-Fragment des Antikörpers IgG binden kann. Dies wiederum ergibt einen verbesserten Schutz gegen Opsonisierung und Phagozytose [136]. Da Virulenz definiert ist als die relative Kapazität, mit welcher ein Mikroorganismus einem empfindlichen Wirt Schaden zufügen kann [137], müsste eine erhöhte Virulenz mit einer erhöhten Rate an Wundinfektionen einher gehen. Daher wurde untersucht, ob zwischen den spa-Typen aus Wund- und Haut-/Schleimhautabstrichen Unterschiede bezüglich der Repeatlängen existieren (siehe Tabelle 11). Von den 48 spa-Typen aus 638 Wundabstrichen weisen 59 % eine Repeatregion  $\geq 8$  auf und von 33 spa-Typen aus 476 Haut-/Schleimhautabstrichen 73 %. Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass lange Repeatregionen  $\geq 8$  offenbar verstärkt vorkommen. Eine Aufschlüsselung aller an der UMM nachgewiesenen spa-Typen (ab zwei Isolaten) in Wund- und Haut-/Schleimhautabstriche zeigte, dass die Mehrzahl der spa-Typen sowohl als Besiedlungs- wie auch als Wundkeime auftraten (siehe Abbildung 6). Sieben spa-Typen waren nur in Wund- oder nur in Haut-/Schleimhautabstrichen nachweisbar. Da diese spa-Typen jedoch nur zwischen zwei- und sechsmal nachgewiesen wurden, ist davon auszugehen, dass bei einer größeren Fallzahl auch Isolate im jeweils anderen Milieu gefunden werden würden. Die acht häufigsten spa-Typen der UMM (siehe Tabelle 9) waren durchgängig in beiden Abstrichlokalisationen nachweisbar, wobei t032, t014 und t024 prozentual betrachtet deutlich häufiger als Besiedlungskeim denn als Wundkeim detektiert wurden. Auch für die weniger häufigeren spa-Typen t001, t004 und t1007 konnten derartige Unterschiede belegt werden, wobei lediglich t001 und t1007 prozentual doppelt so häufig als Wund- denn als Besiedlungskeim auftraten und t004 viermal häufiger als Besiedlungskeim diagnostiziert wurde. Neun von 22 spa-Typen zeigten sehr ähnliche prozentuale Verteilungen als Wund- und Besiedlungskeime. Demnach konnten zwar für bestimmte spa-Typen Tendenzen belegt werden, welche jedoch gegen eine Annahme der Virulenztheorie sprechen, da die vier spa-Typen, welche mindestens doppelt so häufig als Besiedlungskeime denn als Wundkeime auftraten, alle eine Repeatregion  $\geq 8$  aufwiesen. Demgegenüber besaßen die zwei spa-Typen, welche häufiger als Wundkeime detektiert wurden, in einem Fall mehr und im anderen weniger als acht Repeats. Die Ergebnisse sprechen somit eher für einen Kolonisationsvorteil, bedingt durch längere X-Regionen. Da die Virulenz von *S. aureus* aus synergistischen Interaktionen einer Vielzahl von Toxinen und Faktoren entsteht [133] ist es möglich, aber nicht erwiesen, dass eine verlängerte

Repeatregion Mechanismen begünstigt, welche die Virulenz oder auch das epidemische Potential von MRSA erhöhen. Da die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass MRSA mit einer langen X-Region prinzipiell häufiger vorkommen, egal ob es sich um Epidemiestämme handelt oder nicht, und dass bestimmte spa-Typen mit einer Repeatzahl  $\geq 8$  tendenziell eher als Besiedlungskeime auftreten, während für Wundkeime keine derartigen Tendenzen festgestellt werden konnten, muss die Allgemeingültigkeit der Thesen von FRÉNAVY *et al.* [11] in Frage gestellt werden. Die Untersuchungsergebnisse bestätigen jedoch die Aussage von PIROFSKI & CASADEVALL [137], dass die Beurteilung der Virulenz relativ ist, da es kein absolutes Maß gibt, mittels dessen sie festgestellt werden kann.

### 5.1.5 Fazit

An beiden Kliniken des Mainzer Raumes wurden nicht nur die gleichen spa-Typen nachgewiesen, sondern auch ähnliche Häufigkeiten. Der mit über 70 % an beiden Kliniken dominierende Keim war t003. Dieser konnte mittels PFGE weiter differenziert werden, wobei alle lokal assoziierten t003 in die Obergruppe VI geclustert wurden. Diese Gruppe beinhaltete jedoch außer t003 allein an der UMM noch 21 weitere spa-Typen, und 83 % aller an der UMM untersuchten MRSA wiesen ein mit dieser Obergruppe assoziiertes Schnittmuster auf. Diese Ergebnisse belegen für die überwiegende Mehrzahl der im Mainzer Raum vorherrschenden MRSA eine phylogenetische Verwandtschaft.

Da der Vergleich der vorherrschenden MRSA an UMM und KKM keine Unterschiede ergab, kann daraus geschlossen werden, dass sich diese Keime im Laufe der Zeit auch in der Bevölkerung verbreitet haben.

Eine exemplarische Übersicht zur Verteilung von Isolaten aus der größten PFGE-Gruppe VII auf die einzelnen klinischen Bereiche der UMM zeigte, dass dieser Klon zwar durchaus immer wieder in ein und demselben Bereich detektiert wurde, doch die zeitlichen Abstände der Nachweise waren meist so groß, dass zwischen den einzelnen Fällen keine Verbindung hergestellt werden konnte (siehe Tabelle 16). Selbst wenn innerhalb kürzester Zeit in einem klinischen Bereich zwei oder mehrere Nachweise erfolgen würden, könnte aufgrund der Dominanz dieser Gruppe nicht auf eine Übertragung geschlossen werden. Abhilfe könnte ein MRSA-Screening, für jeden Patienten bei oder vor der Aufnahme ins Krankenhaus, schaffen. Denn dann könnte zwischen mitgebrachten und nosokomial erworbenen MRSA unterschieden werden und im Ausbruchfall wäre eine Interpretation des Geschehens einfacher.

Bezüglich der Untersuchungen zum Zusammenhang einer X-Region  $\geq 8$  mit gesteigertem epidemischen Potential, bzw. erhöhter Virulenz, konnten die Ergebnisse von FRÉNAVY *et al.* [11] nicht uneingeschränkt bestätigt werden. Es ergab sich, dass die überwiegende Mehrzahl der im Mainzer Raum vorkommenden spa-Typen eine X-Region  $\geq 8$  aufwies und somit die Wahrscheinlichkeit von vornherein höher ist, dass Epidemiestämme ebenfalls längere Repeatregionen aufweisen. Die Analysen zur Virulenz belegten, dass eine lange X-Region zu 59 % unter den spa-Typen aus Wundabstrichen und 73 % in Haut-/Schleimhautabstrichen nachgewiesen wurden. Somit konnte nicht belegt werden, dass MRSA mit längeren Repeatregionen virulenter sind als andere. Vielmehr lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass längere X-Regionen in einer noch unbekanntem Art und Weise einen Selektionsvorteil darstellen, welcher eher die Kolonisation als die Infektion von Wirten begünstigt. Prinzipiell sollte jedoch nicht angenommen werden, dass das Vorhandensein eines speziellen Faktors immer zu ganz bestimmten Ergebnissen führt. Der Erfolg eines Bakteriums ist immer bedingt durch seine Anpasstheit an bestehende Umweltbedingungen und die Kongruenz von Wirtsbedingungen- und Bakterieneigenschaften.

### **5.2 Untersuchungen zum PVL-Status und der caMRSA Detektion an der UMM**

Das Vorhandensein des PVL-Gens wurde in der Literatur in Zusammenhang mit reduzierter Resistenz und den vorhandenen SCCmec-Typen IV und V bisher als eindeutiger Hinweis auf caMRSA gewertet [111; 138-140]. Es häufen sich jedoch Berichte, welche anhand der Unterscheidungskriterien, egal wie weit oder eng sie gefasst werden, zu keinem einheitlichen Ergebnis mehr kommen. MCCARTHY *et al.* [141] sprechen daher erstmals davon, dass eine Unterscheidung und somit Detektion von caMRSA im Krankenhaus keine wichtige Rolle mehr spielt. Bisher halten Wissenschaftler jedoch weiterhin an der Unterscheidung von ca- und haMRSA fest, doch das Fehlen einheitlicher Definitionen [142] gepaart mit dem verstärkten Nachweis von caMRSA in Krankenhäusern [49-52] und haMRSA in der Bevölkerung [45-48] macht eine korrekte Unterscheidung anhand epidemiologischer Charakteristika nahezu unmöglich [115]. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob und in wie weit es möglich ist, die klassischen PVL-positiven caMRSA anhand ihrer genetischen Charakteristika von haMRSA zu unterscheiden.

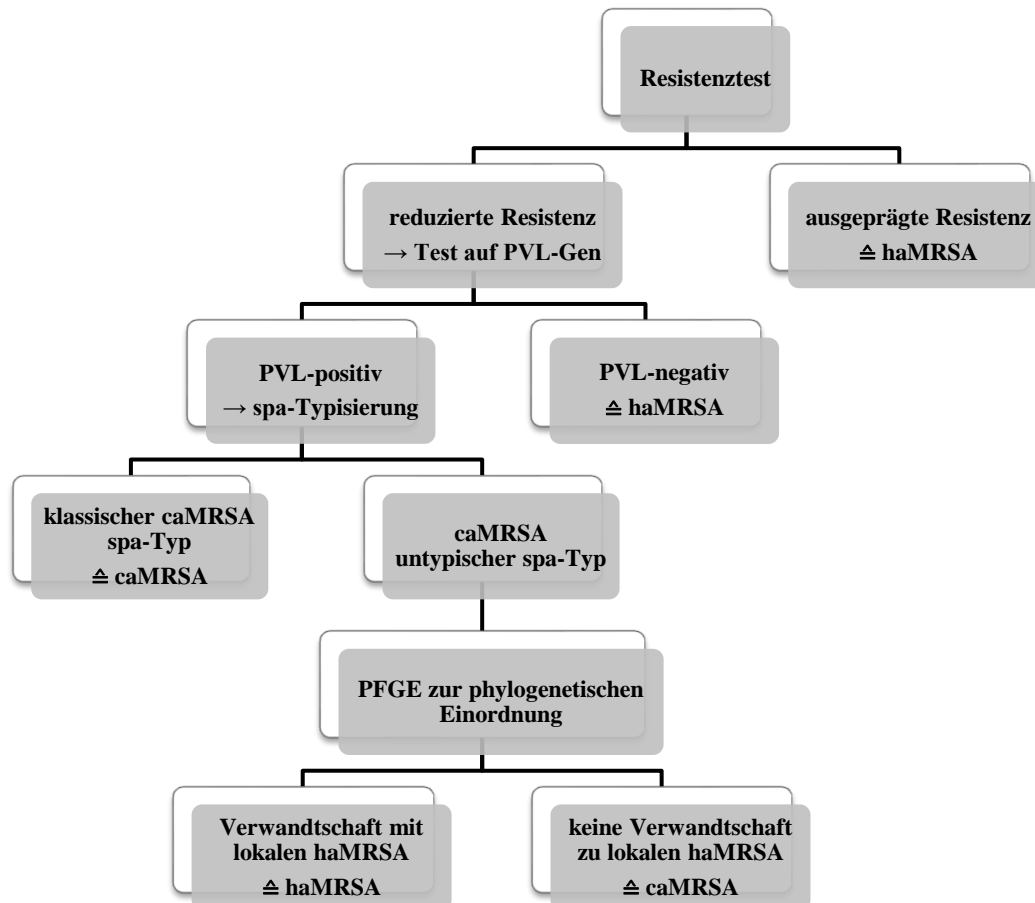
### **5.2.1 Methodik zur Bestimmung klassischer PVL-positiver caMRSA**

Da in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte, ob eine Identifizierung klassischer PVL-positiver caMRSA basierend auf mikrobiologischen Methoden möglich ist, wurde zunächst analysiert, ob das Resistenzverhalten von PVL-positiven- und -negativen MRSA einen möglichen Ansatzpunkt für eine Unterscheidung zwischen ca- und haMRSA liefert. Festgestellt wurde, dass PVL-positive MRSA überwiegend Resistenzmuster mit Empfindlichkeit gegen Erythromycin, Clindamycin und/oder Levofloxacin aufwiesen, während PVL-negative MRSA zumeist ein umgekehrtes Bild zeigten (siehe Tabelle 20). Daraus wurde eine Unterscheidung in ausgeprägte- (resistent gegen Erythromycin, Clindamycin und/oder Levofloxacin) und reduzierte (sensibel gegen Erythromycin, Clindamycin und/oder Levofloxacin) Resistenz abgeleitet. Da neben diesen drei Antibiotika auch Resistenzen gegen weitere Antibiotika (z. B. Tetracyclin, Gentamicin oder Fusidinsäure) auftraten, diese jedoch bei der Beurteilung nicht berücksichtigt wurden, ergibt sich aus diesem Vorgehen eine Ausweitung der bisher für caMRSA angenommenen Resistenzen ( $\beta$ -Lactamresistenz plus ein bis zwei weitere Resistenzen, siehe Tabelle 1). Dieses Vorgehen erwies sich in der vorliegenden Arbeit als zuverlässig und ermöglichte die Einbeziehung von caMRSA, welche dem aktuellen Trend hin zur Multiresistenz folgten [8; 53-55].

Die durchgeführte Verteilungsanalyse PVL-positiver und -negativer MRSA auf die jeweiligen Resistenzausprägungen (siehe Abbildung 13) belegte eine sehr gute Abgrenzung des zu 74 % an der UMM vorherrschenden t003, was die Grundvoraussetzung für die Anwendbarkeit der in dieser Arbeit vorgestellten Methodik bildete. Nachfolgend konnte mittels der spa-Typen-Verteilung gezeigt werden, dass in die Gruppe der MRSA mit reduzierter Resistenz und dem PVL-Gen neben vier fraglichen caMRSA assoziierten spa-Typen hauptsächlich die aus der Literatur bekannten caMRSA t008, t044 und t019 eingeordnet wurden (siehe Abbildung 14). Die vier fraglichen caMRSA wurden jeweils nur einmal nachgewiesen, während die klassischen caMRSA insgesamt 19 Isolate umfassten. Für alle vier fraglichen spa-Typen ergab die PFGE eine Verbindung zu lokal vorherrschenden haMRSA assoziierten Keimen. Da caMRSA sich deutlich von lokalen haMRSA unterscheiden [118], konnte die Einordnung dieser Isolate mittels PFGE eindeutig geklärt werden. Die entwickelte Methode zeigte sich demnach als zuverlässig und eindeutig bei der Differenzierung klassischer PVL-positiver caMRSA.

Da auch auf das Vorhandensein atypischer caMRSA (siehe Tabelle 22) geachtet wurde, ein solcher Fall jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, muss daraus geschlossen werden, dass

die Differenzierung von caMRSA und haMRSA zumindest lokal gesehen und mit Beschränkung auf die klassischen PVL-positiven caMRSA (t008, t019, t044) an der UMM sehr gut möglich ist. Aus den Daten der vorliegenden Arbeit konnte daher ein zuverlässiges Beurteilungsschema zur Diagnostik dieser caMRSA entwickelt werden (siehe Abbildung 20):



**Abbildung 20** Schema zur Bestimmung von klassischen PVL-positiven caMRSA anhand diagnostischer Methoden.

Das Besondere der hier vorgenommenen Differenzierung liegt in dem Umstand, dass keinerlei patientenbezogene, epidemiologische, demografische oder klinische Daten einbezogen wurden. Hintergrundinformationen zu Alter, Geschlecht, ethnischer Zugehörigkeit, Art der Infektion etc. waren aufgrund des Studiendesigns größtenteils nicht mehr zugänglich und wurden daher nicht in die caMRSA-Analyse einbezogen. Aktuelle Studien belegen im Nachhinein dieses Vorgehen als korrekt, denn aufgrund der immer weiter voranschreitenden Vermischung von ca- und ha MRSA sollte das Augenmerk bei der Differenzierung allein auf den genetischen Unterschieden liegen [9; 56; 59]. Parallel und unabhängig von der vorliegenden Arbeit, testeten HETEM *et al.* [115] erfolgreich eine

## *Diskussion*

Kombination aus spa-Typisierung und PVL-Nachweis, um caMRSA diagnostizieren zu können. Der Fokus dieser Arbeit richtete sich ebenfalls auf die klassischen, ursprünglichen PVL-positiven caMRSA mit bekannten spa-Typen.

Von allen 762 untersuchten MRSA der UMM handelte es sich bei 3 % um typische caMRSA und weitere 3 % entsprachen PVL-positiven haMRSA. Demzufolge würden bei einem routinemäßigen Test auf das Vorhandensein des PVL-Gens ebenso viele haMRSA (wie z. B. t003) als Träger des Gens identifiziert werden, wie klassische caMRSA. Zwar bestätigten die Daten, dass PVL bei haMRSA insgesamt zu  $\leq 5$  % vorkommt und in der vorliegenden Arbeit bei 100 % der caMRSA (siehe Tabelle 1), doch für eine zuverlässige Bestimmung klassischer caMRSA ergab sich die Detektion des PVL-Gens allein als vollkommen unzureichend. Daher erfolgte die Beurteilung der Keime in dieser Dissertation zunächst anhand eines Resistenztests. Es konnte gezeigt werden, dass PVL-positive haMRSA sich von caMRSA bezüglich ihrer Resistenzen ebenso unterscheiden, wie es von haMRSA und caMRSA zu erwarten war (siehe Tabelle 1). So wiesen 85 % der PVL-positiven haMRSA eine ausgeprägte Resistenz und nur 15 % eine reduzierte Resistenz auf, während caMRSA nur reduzierte Resistenzen besaßen. Demnach ist das PVL-Gen unter haMRSA eher assoziiert mit ausgeprägter Resistenz und unter caMRSA mit reduzierter Resistenz, wodurch eine sinnvolle Vorselektion potentieller caMRSA anhand von Resistenztests möglich ist.

Das Verfahren ist sehr gut geeignet für Labore, welche nicht nur einen MRSA-Nachweis, sondern auch eine umfangreiche mikrobiologische MRSA-Routinediagnostik durchführen. Das Anlegen von Resistenztests ist gängiger Standard und zumeist zählt auch schon der PCR-basierte Nachweis des PVL-Gens dazu. Mittels des in Abbildung 20 dargestellten Verfahrens und der in dieser Arbeit empfohlenen Resistenzinterpretation kann der Verdacht auf das Vorliegen klassischer caMRSA bereits von Routinelaboren ausgesprochen werden. Die weitere Differenzierung mittels Keimtypisierung bedarf eines entsprechend ausgerüsteten Labors, wobei die Verfügbarkeit einer Datenbank zum Vergleich der potentiellen caMRSA mit lokal vorherrschenden Keimen notwendig ist.

Da der Arbeitsaufwand für die Diagnostik ein wichtiger Faktor ist, wurde eine Extrapolation basierend auf den Daten der auf ihre Resistenz getesteten Stichprobe durchgeführt (siehe Abbildung 15). Anhand dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass durchschnittlich 14 % aller MRSA der UMM ein reduziertes Resistenzmuster aufweisen. Dieser Anteil ist sehr gering, so dass die Menge der MRSA, welche täglich auf das Vorhandensein des PVL-Gens untersucht werden müssten, sich in durchführbaren Grenzen hält. Von den getesteten Isolaten

würden sich 21 % als PVL-positiv erweisen und bedürften einer weiteren Differenzierung durch die spa-Typisierung (siehe Abbildung 20). Bei einem klassischen caMRSA assoziierten spa-Typ steht das Ergebnis an dieser Stelle fest. Eine nachfolgende PFGE würde der Datensammlung und der Vervollständigung der lokalen Datenbank dienen. Ist das Ergebnis der spa-Typisierung jedoch ein caMRSA untypischer spa-Typ, so ist die Durchführung einer PFGE zu Vergleichszwecken mit lokalen haMRSA und somit zur Beurteilung des Keims zwingend erforderlich.

### 5.2.2 Verbreitung von caMRSA und PVL-positiven haMRSA an der UMM

Da das Vorkommen des PVL-Gens nicht auf caMRSA beschränkt ist und dieses Toxin assoziiert wird mit der Lyse von Granulozyten und Monozyten, Gewebnekrosen und schweren Infektionen bis hin zu chronischer Osteomyelitis [32-35; 81], war es von großem Interesse die Verbreitung dieses Gens an der UMM zu untersuchen.

Insgesamt wurden 45 PVL-positiv MRSA unter den 762 Isolaten der UMM detektiert (siehe Tabelle 19), was 6 % der Gesamtuntersuchungsmenge entspricht. Der Anteil aller PVL-positiven Isolate (inklusive caMRSA) schwankte von 2004 bis 2008 zwischen 5,1 % und 6,6 % (siehe Abbildung 16). Für Österreich berichten KRZIWANEK *et al.* [80] in den Jahren 2005 und 2006 von einem Anstieg der Rate PVL-positiver MRSA von 3,7 % auf 7,7 % unter allen MRSA, und in den Niederlanden wiesen WANNET *et al.* [143] 2000 noch eine Inzidenz von 5 % und 2002 schon von 15 % nach. Im Gegensatz zu den Berichten aus Österreich und den Niederlanden zeigte sich der Anteil PVL-positiver MRSA innerhalb der fünf Untersuchungsjahre an der UMM als gleichbleibend stabil.

Die 45 PVL-positiven MRSA aus dieser Dissertation setzten sich zu 42 % aus caMRSA und zu 58 % aus haMRSA zusammen. Der Anteil klassischer caMRSA schwankte zwischen 1,4 % und 4 % während der fünf Untersuchungsjahre und der Anteil PVL-positiver haMRSA zwischen 2 % und 4,7 % (siehe Abbildung 16). Es ergab sich in beiden Gruppen kein eindeutiger Trend einer stetigen Zu- oder Abnahme. Die beobachtete Konstanz ist konträr zu Entwicklungen in Ländern wie den USA, welche schon während des Untersuchungszeitraums eine drastische Zunahme von caMRSA in Krankenhäusern verzeichneten [50-52; 59]. An der UMM konnten jedoch keine Anzeichen für eine Verdrängung lokaler haMRSA (weder PVL-positiver noch -negativer) durch caMRSA festgestellt werden. Und auch der Anteil PVL-positiver haMRSA erwies sich im Vergleich mit Ländern wie Tunesien, wo mehr als die

## *Diskussion*

Hälfte aller haMRSA PVL-positiv getestet wurden [144] als äußerst gering. Allem Anschein nach verhindern die suffizienten Hygienemaßnahmen an der UMM eine Ausbreitung von MRSA-Typen, welche in anderen Ländern große Schwierigkeiten durch starke Ausbreitung verursachen.

Die Betrachtung der Verteilung von caMRSA und PVL-positiven haMRSA innerhalb der einzelnen klinischen Bereiche ergab für PVL-positive haMRSA eine weite Verbreitung und für caMRSA eine Beschränkung auf lediglich vier klinische Bereiche (siehe Abbildung 17). Da hier der Verdacht einer Übertragung besteht, wurden die betreffenden Patienten aus den jeweiligen vier klinischen Bereichen auf mögliche Gemeinsamkeiten untersucht. Lediglich in einem Fall konnte ein Zusammenhang bestätigt werden, wobei es sich um eine Mutter-Kind-Übertragung handelte. Alle anderen caMRSA Nachweise waren unabhängig voneinander. Bei den vier Bereichen mit caMRSA-Nachweisen handelte es sich um die Kinderklinik, die Hautklinik, chirurgische Stationen und Ambulanzen/Polikliniken. Diese vier Bereiche stellen aufgrund der Risikofaktoren für caMRSA (siehe Tabelle 1) die prädestinierten Nachweisorte für diese Art von Keim dar [30; 39-41]. So sollte caMRSA als bevölkerungsassoziierter Keim außerhalb der Kliniken verstärkt auftreten, was mit dem Nachweis in Ambulanzen und Polikliniken übereinstimmt. Betroffen sind zumeist junge, gesunde Individuen, was für einen Nachweis in der Kinderklinik spricht. Da Haut- und Weichgewebeeinfektionen sehr häufig mit caMRSA in Verbindung gebracht werden, kommen die Hautklinik und alle chirurgischen Stationen auch als primäre Behandlungsorte für caMRSA-Infektionen unterschiedlichster Schweregrade in Betracht.

Neben der Abgrenzung von typischen klinischen Bereichen, sollte auch eine Abgrenzung von caMRSA und PVL-positiven haMRSA gegenüber den Abstrichlokalisationen in welchen PVL-negative haMRSA gefunden wurden möglich sein. Diese Vermutung basiert auf der Assoziation des PVL-Gens mit der Entstehung schwerer nekrotischer Haut- und Weichgewebeeinfektionen [33-35]. Die entsprechende Untersuchung belegte, dass caMRSA in sieben, PVL-positive haMRSA in acht und PVL-negative haMRSA in 27 von 27 möglichen Abstrichlokalisationen nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 18). In sechs Lokalisationen kamen MRSA aus allen drei Gruppen vor, wobei sich teilweise stark ausgeprägte prozentuale Tendenzen einer Gruppe innerhalb einer Lokalisation zeigten. So dominierten caMRSA unter den Abstrichen aus den Bereichen Abszess, intraoperativ und mikrobiologische Körperabstriche, während PVL-positive haMRSA in Haut-/Schleimhautabstrichen, Abstrichen ohne Angabe und Wundabstrichen dominierten. PVL-negative MRSA bildeten in



keiner der sechs Lokalisationen die prozentuale Mehrheit. Die Verteilungen der drei Gruppen lassen den Schluss zu, dass PVL-positive haMRSA und caMRSA prozentual gesehen häufiger in bestimmten Abstrichlokalisationen zu finden sind, während PVL-negative MRSA eine breitere Vielfalt aufweisen. Dies könnte zum einen durch die sehr geringen Fallzahlen PVL-positiver haMRSA und caMRSA bedingt sein, zum anderen könnte hierin die Bestätigung für das verstärkte Vorkommen von PVL-positiven MRSA in Haut- und Weichgewebeeinfektionen (siehe Tabelle 1) gesehen werden. Leider lassen die Abstrichlokalisationen nicht immer einen Rückschluss auf die Art der vorliegenden Infektion zu, aber die Häufungen von caMRSA in den Lokalisationen Abszess und Pus, und PVL-positiver haMRSA in Wundabstrichen, stellen einen deutlichen Hinweis auf das Vorliegen von Haut- und Weichgewebeeinfektionen dar. Da jedoch auch eine Dominanz dieser MRSA in anderen Lokalisationen beobachtet wurde, welche mehr Interpretationsspielraum über die Infektionsart offen lassen und in welchen sie nicht alleinig detektiert wurden, wird vermutet, dass das PVL-Gen nicht zwangsläufig mit einer bestimmten Art von Infektionen assoziiert werden kann. Letztendlich ist jedoch der Informationsgehalt der Abstrichlokalisationen zu gering, um daraus die in Tabelle 1 genannten spezifischen Infektionsarten bestätigen oder widerlegen zu können.

Eine Auffälligkeit, welche in dieser Art selten Erwähnung findet, zeigte sich in dem hohen prozentualen Anteil PVL-positiver und -negativer haMRSA, sowie caMRSA von jeweils über 20 % in Haut-/Schleimhautabstrichen. Diese Beobachtung belegt, dass das Vorhandensein des PVL-Gens nicht zwangsläufig zu Infektionen führt. Somit unterstützen die Ergebnisse dieser Dissertation die Studien, welche belegen, dass, entgegen früherer Annahmen, PVL nicht die Pathogenität eines Bakteriums erhöht [145-148]. Untersuchungen invasiver MRSA-Stämme bezüglich der Ausstattung mit verschiedenen Virulenzdeterminanten zeigten, dass alle vorhandenen Faktoren kumulativ wirkten und keine Kombination mehr oder weniger Infektionen verursachte als eine andere [149]. Diese Erkenntnis lässt darauf schließen, dass höhere Virulenz und Letalität nicht durch ein Gen allein verursacht werden, sondern immer multifaktorielle Ursachen haben [148; 149]. Somit muss MCCARTHY *et al.* [141] zugestimmt werden, welche postulierten, dass eine Behandlung nach dem Infektionstyp und der Schwere der Erkrankung auszurichten ist, wobei die eingesetzten Antibiotika immer anhand des spezifischen Resistogramms und nicht nach der Einordnung als PVL-positiver Keim bzw. ca- oder haMRSA ausgewählt sollten. Ergänzend belegen aktuelle Studien, dass nicht der MRSA-Typ für das klinische Resultat verantwortlich ist, sondern allein die Wirtsfaktoren und der Schweregrad der vorliegenden Erkrankung [150-152].

### **5.2.3 Fazit**

In der Vorliegenden Arbeit zeigten sich keinerlei Schwierigkeiten bei der Unterscheidung von ca- und haMRSA. Die genetischen Faktoren der reduzierten Resistenz und das Vorhandensein des PVL-Gens erwiesen sich als hervorragend geeignet, um eine Vorselektion potentieller caMRSA zu treffen. Bei der Beurteilung der Resistenz wurden die aktuellen Entwicklungen bezüglich zunehmender Resistenzen berücksichtigt, ein hoch multiresistenter caMRSA [53-55] konnte jedoch nicht bestätigt werden. Die vorselektierten potentiellen caMRSA konnten mittels spa-Typisierung und PFGE zweifelsfrei als ca- oder haMRSA eingeordnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass patientenbezogene-, demografische- und klinische Informationen bei der Beurteilung eines Keims nicht notwendig sind. Somit müssen caMRSA-Definitionen, welche z. B. ein Vorkommen nur in der Bevölkerung oder eine Detektion innerhalb von 24-48h nach Aufnahme in eine Klinik beinhalten, als überholt angesehen werden. Für eine erfolgreiche Diagnostik PVL-positiver caMRSA sollte der Fokus allein auf der genetischen Ausstattung des Keims liegen.

Für caMRSA konnte ein ausschließliches Vorkommen in prädestinierten Risikobereichen nachgewiesen werden. Die Assoziation mit Haut- und Weichgewebeeinfektionen konnte für die Abstrichlokalisationen Pus und Abszess einwandfrei hergestellt werden, für weiterführende Beurteilung erwies sich der Informationsgehalt der Abstrichlokalisationen jedoch als zu gering.

Als Auffälligkeit wurde das starke Vorkommen von PVL-positiven und -negativen haMRSA sowie caMRSA unter den Haut-/Schleimhautabstrichen gewertet. Dies zeigte, dass sich aus einer Besiedlung mit MRSA nicht zwangsläufig eine Infektion ergibt, selbst wenn es sich bei dem Keim um einen mit vorhandenem PVL-Gen handelt. Diese Ergebnisse bestätigen aktuelle Publikationen, welche postulieren, dass das PVL-Gen nicht zwangsläufig mit erhöhter Pathogenität einhergeht [145-148]. Möglicherweise mangelt es häufig an empfindlichen Wirten, bzw. resultiert eine Wirt-Bakterium-Interaktion nur bei Konkordanz von wirtsgegebenen Voraussetzungen und bakteriengeforderten Bedingungen in der Ausprägung möglicher Virulenzfaktoren [150-152]. Dies könnte auch der Grund sein, warum Studien zur Pathogenität/Virulenz des PVL-Gens zu konträren Ergebnissen kommen.

Insgesamt ergaben sich keine Hinweise darauf, dass an der UMM lokale haMRSA durch caMRSA verdrängt wurden, wie es für den Untersuchungszeitraum vor allem in den USA berichtet wurde [50-52; 59]. Auch die Gesamtzahl PVL-positiver MRSA blieb konstant niedrig, entgegen den Entwicklungen in Österreich [80] und den Niederlanden [143]

## **6. Zusammenfassung**

MRSA ist der wohl bekannteste nosokomiale Infektionserreger weltweit. Die aktuelle Situation ist aufgrund der schnellen Ausbreitung, vor allem von caMRSA, in einigen Ländern besorgniserregend. Für den Raum Mainz konnte innerhalb der fünf Untersuchungsjahre eine stabile Populationsstruktur nachgewiesen werden, welche hauptsächlich aus deutschlandweit bekannten Epidemiestämmen gebildet wird. Als Besonderheit ergab sich die Dominanz des spa-Typs t003 (> 70 %), sowie das Vorherrschen hoch klonaler Strukturen an UMM und KKM. Diese Umstände lassen auf eine weite Verbreitung von MRSA, speziell des spa-Typs t003, innerhalb der Bevölkerung schließen. Die Bestätigung dieser Vermutung bedarf jedoch weiterer prospektiver Forschung außerhalb der Kliniken.

An der UMM konnte im Untersuchungszeitraum 2004-2008 keine Zunahme von klassischen PVL-positiven caMRSA (t008, t019 und t044) festgestellt werden, womit zumindest momentan noch keine Verdrängung von haMRSA durch caMRSA belegt werden konnte.

Die von WITTE *et al.* [99] postulierte 5 % Grenze für den häufigsten detektierten Typ einer Typisierungsmethode muss dahingehend modifiziert werden, dass diese Bedingung zwar allgemein für ein Typisierungsverfahren, nicht aber für lokale Populationen gelten sollte. Im Falle des Vorherrschens klonaler Linien und Subtypen würde keine Methode ausreichend diskriminatorische Eigenschaften aufweisen.

Die Kombination von spa-Typisierung und PFGE konnte, mit Einschränkungen für den vorherrschenden t003, als geeignet im Falle der Keimdifferenzierung während eines Ausbruchs befunden werden. Als vorteilig für die Interpretation würde sich die Einführung eines generellen MRSA-Screenings für jeden Patienten bei Aufnahme auswirken.

Die Überprüfung der Thesen von FRÉNAY *et al.* [11] ergab keinen Zusammenhang zwischen einer X-Region  $\geq 8$  Repeats und einem erhöhtem Virulenzpotential. Bezüglich des gesteigerten epidemischen Potentials wurde festgestellt, dass lange X-Regionen generell häufiger auftreten als kurze und somit ein begünstigender Einfluss bei der Kolonisation vermutet aber nicht bewiesen werden kann.

Für die Detektion von klassischen caMRSA konnte ein Ablaufschema mit Interpretationsrichtlinien erarbeitet werden, welches eine korrekte Differenzierung auch ohne die Einbeziehung patientenbezogener Daten ermöglicht. Die Anlage einer lokalen Datenbank zeigte sich dabei als unbedingt notwendig um strittige Fälle als ha- oder caMRSA einzuordnen.

## Literaturverzeichnis

1. **Dietze B., Rath A., Wendt C. & Martiny H.** - *Survival of MRSA on sterile goods packaging.* Journal of Hospital Infection. 2001, 49(4): 255-261.
2. **Wagenvoort J. H., Sluijsmans W. & Penders R. J.** - *Better environmental survival of outbreak vs. sporadic MRSA isolates.* Journal of Hospital Infection. 2000, 45(3): 231-234.
3. **Monecke S., Coombs G., Shore A. C., Coleman D. C., Akpaka P., Borg M., Chow H., Ip M., Jatzwauk L., Jonas D., Kadlec K., Kearns A., Laurent F., O'Brien F. G., Pearson J., Ruppelt A., Schwarz S., Scicluna E., Slickers P., Tan H. L., Weber S. & Ehrlich R.** - *A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus.* Plos One. 2011, 6(4): e17936.
4. **RKI** - *Zur MRSA Situation in Deutschland 2005 und 2006.* Epidemiologisches Bulletin. 2007, (6): 41-46.
5. **RKI** - *Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2008.* Epidemiologisches Bulletin. 2009, (17): 155-160.
6. **RKI** - *Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010.* Epidemiologisches Bulletin. 2011, (26): 233-241.
7. **Strommenger B., Cuny C., Werner G. & Witte W.** - *Obvious lack of association between dynamics of epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus in central Europe and agr specificity groups.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2004, 23(1): 15-19.
8. **McDougal L. K., Fosheim G. E., Nicholson A., Bulens S. N., Limbago B. M., Shearer J. E., Summers A. O. & Patel J. B.** - *Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates causing invasive disease in the United States.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010, 54(9): 3804-3811.
9. **Chua K., Laurent F., Coombs G., Grayson M. L. & Howden B. P.** - *Not Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA)! A Clinician's Guide to Community MRSA - Its Evolving Antimicrobial Resistance and Implications for Therapy.* Clinical Infectious Diseases. 2011, 52(1): 99-114.
10. **Fluit A. C., Wielders C. L., Verhoef J. & Schmitz F. J.** - *Epidemiology and susceptibility of 3,051 Staphylococcus aureus isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study.* Journal of Clinical Microbiology. 2001, 39(10): 3727-3732.

11. **Frénay H. M., Theelen J. P., Schouls L. M., Vandenbroucke-Grauls C. M., Verhoef J., van Leeuwen W. J. & Mooi F. R.** - *Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains on the basis of protein A gene polymorphism.* Journal of Clinical Microbiology. 1994, 32(3): 846-847.
12. **Ogston A.** - *Micrococcus Poisoning.* Journal of Anatomy and Physiology. 1882, 17(Pt 1): 24-58.
13. **Rosenbach F. I.** - *Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen.* J. F. Bergmann. Wiesbaden. 1884.
14. **Chapman G. H., Berens C., Peters A. & Curcio L.** - *Coagulase and Hemolysin Tests as Measures of the Pathogenicity of Staphylococci.* Journal of Bacteriology. 1934, 28(4): 343-363.
15. **Martins A. & Cunha Mde L.** - *Methicillin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects.* Microbiology and Immunology. 2007, 51(9): 787-795.
16. **Hirschhausen N.** - *Staphylococcus aureus.* <http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/190.htm>. 2006. (Accessed: 10.01.2012).
17. **Rammelkamp C. H. & T. M.** - *Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin.* Experimental Biology and Medicine. 1942, 51(3): 386-389
18. **Lowy F. D.** - *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus.* Journal of Clinical Investigation. 2003, 111(9): 1265-1273.
19. **Jevons M. P.** - *"Celbenin" - resistant Staphylococci.* British Medical Journal. 1961, 1(5219): 124-125.
20. **Ubukata K., Nonoguchi R., Matsuhashi M. & Konno M.** - *Expression and inducibility in Staphylococcus aureus of the mecA gene, which encodes a methicillin-resistant S. aureus-specific penicillin-binding protein.* Journal of Bacteriology. 1989, 171(5): 2882-2885.
21. **Ito T., Hiramatsu K., Oliveira D. C., de Lencastre H., Zhang K. Y., Westh H., O'Brien F., Giffard P. M., Coleman D., Tenover F. C., Boyle-Vavra S., Skov R. L., Enright M. C., Kreiswirth B., Ko K. S., Grundmann H., Laurent F., Sollid J. E., Kearns A. M., Goering R., John J. F., Daum R., Soderquist B. & Sta I. W. G. C.** - *Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009, 53(12): 4961-4967.
22. **Wang L. & Archer G. L.** - *Roles of CcrA and CcrB in Excision and Integration of Staphylococcal Cassette Chromosome mec, a Staphylococcus aureus Genomic Island.* Journal of Bacteriology. 2010, 192(12): 3204-3212.

23. **Carbon C.** - *MRSA and MRSE: is there an answer?* Clinical Microbiology and Infection. 2000, 6(2): 17-22.
24. **de Neeling A. J., van Leeuwen W. J., Schouls L. M., Schot C. S., van Veen-Rutgers A., Beunders A. J., Buiting A. G., Hol C., Ligtoet E. E., Petit P. L., Sabbe L. J., van Griethuysen A. J. & van Embden J. D.** - *Resistance of staphylococci in The Netherlands: surveillance by an electronic network during 1989-1995.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998, 41(1): 93-101.
25. **Jones R. N., Low D. E. & Pfaller M. A.** - *Epidemiologic trends in nosocomial and community-acquired infections due to antibiotic-resistant gram-positive bacteria: the role of streptogramins and other newer compounds.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 1999, 33(2): 101-112.
26. **Melo-Cristino J.** - *Antimicrobial resistance in staphylococci and enterococci in 10 Portuguese hospitals in 1996 and 1997. POSGAR. Portuguese Study Group of Antimicrobial Resistance.* Microbial Drug Resistance. 1998, 4(4): 319-324.
27. **Schmitz F. J., Verhoef J. & Fluit A. C.** - *Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. Sentry Participants Group.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1999, 43(6): 783-792.
28. **Foster T. J.** - *The Staphylococcus aureus "superbug".* Journal of Clinical Investigation. 2004, 114(12): 1693-1696.
29. **Chemicell** - *Protocol for purification of IgG molecules with SiMAG-Protein A or SiMAG-Protein G.* <http://www.chemicell.com/products/protocols/protein/index.html>. (Accessed: 14.02.2012).
30. **Boakes E., Kearns A. M., Ganner M., Perry C., Hill R. L. & Ellington M. J.** - *Distinct Bacteriophages Encoding Panton-Valentine Leukocidin (PVL) among International Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clones Harboring PVL.* Journal of Clinical Microbiology. 2011, 49(2): 684-692.
31. **Ma X. X., Ito T., Kondo Y., Cho M., Yoshizawa Y., Kaneko J., Katai A., Higashiide M., Li S. & Hiramatsu K.** - *Two different Panton-Valentine leukocidin phage lineages predominate in Japan.* Journal of Clinical Microbiology. 2008, 46(10): 3246-3258.
32. **Kreisel K. M.** - *Risk factors and outcomes of infections due to USA300 methicillin-resistant staphylococcus aureus.* Dissertation. University of Maryland, Baltimore. 2009.
33. **Bocchini C. E., Hulten K. G., Mason E. O., Gonzalez B. E., Hammerman W. A. & Kaplan S. L.** - *Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous Staphylococcus aureus osteomyelitis in children.* Pediatrics. 2006, 117(2): 433-440.

34. **Gillet Y., Issartel B., Vanhems P., Fournet J. C., Lina G., Bes M., Vandenesch F., Piemont Y., Brousse N., Floret D. & Etienne J.** - *Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients.* Lancet. 2002, 359(9308): 753-759.
35. **Jung N., Lehmann C., Hellmann M., Seifert H., Valter M. M., Hallek M., Fatkenheuer G. & Kochanek M.** - *Necrotizing pneumonia caused by Panton-Valentine leucocidin-producing Staphylococcus aureus originating from a Bartholin's abscess.* Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 2008, 2008:1-5.
36. **Okuma K., Iwakawa K., Turnidge J. D., Grubb W. B., Bell J. M., O'Brien F. G., Coombs G. W., Pearman J. W., Tenover F. C., Kapi M., Tiensasitorn C., Ito T. & Hiramatsu K.** - *Dissemination of new methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in the community.* Journal of Clinical Microbiology. 2002, 40(Bosn J Basic Med Sci11): 4289-4294.
37. **Köck R., Mellmann A., Schaumburg F., Friedrich A. W., Kipp F. & Becker K.** - *The epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Germany.* Deutsches Ärzteblatt International. 2011, 108(45): 761-767.
38. **RKI** - *Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA.* [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Staphylokokken\\_MRSA.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Staphylokokken_MRSA.html). 2009. (Accessed: 20.03.2012).
39. **Millar B. C., Loughrey A., Elborn J. S. & Moore J. E.** - *Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA).* Journal of Hospital Infection. 2007, 67(2): 109-113.
40. **Deurenberg R. H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A. W., Bruggeman C. A. & Stobberingh E. E.** - *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Clinical Microbiology and Infection. 2007, 13(3): 222-235.
41. **Eady E. A. & Cove J. H.** - *Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus--an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections.* Current Opinion in Infectious Diseases. 2003, 16(2): 103-124.
42. **Chambers H. F. & DeLeo F. R.** - *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era.* Nat Rev Microbiol. 2009, 7(9): 629-641.
43. **David M. Z. & Daum R. S.** - *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic.* Clinical Microbiology Reviews. 2010, 23(3): 616-687.
44. **DeLeo F. R., Otto M., Kreiswirth B. N. & Chambers H. F.** - *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Lancet. 2010, 375(9725): 1557-1568.

45. **Bygott J., Enoch D. A., Carson R. P. & Karas J. A.** - *Presumed community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates reflect spillover of healthcare-associated MRSA.* Journal of Hospital Infection. 2008, 69(2): 197-198.
46. **Calfee D. P., Durbin L. J., Germanson T. P., Toney D. M., Smith E. B. & Farr B. M.** - *Spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among household contacts of individuals with nosocomially acquired MRSA.* Infection Control and Hospital Epidemiology. 2003, 24(6): 422-426.
47. **Lescure F. X., Locher G., Eveillard M., Biendo M., Van Agt S., Le Loup G., Douadi Y., Ganry O., Vandenesch F., Eb F., Schmit J. L. & Etienne J.** - *community-acquired infection with healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of home nursing care.* Infection Control and Hospital Epidemiology. 2006, 27(11): 1213-1218.
48. **Liu C., Graber C. J., Karr M., Diep B. A., Basuino L., Schwartz B. S., Enright M. C., O'Hanlon S. J., Thomas J. C., Perdreau-Remington F., Gordon S., Gunthorpe H., Jacobs R., Jensen P., Leoung G., Rumack J. S. & Chambers H. F.** - *A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease in San Francisco, 2004-2005.* Clinical Infectious Diseases. 2008, 46(11): 1637-1646.
49. **Chung M., de Lencastre H., Matthews P., Tomasz A., Adamsson I., Aires de Sousa M., Camou T., Cocuzza C., Corso A., Couto I., Dominguez A., Gniadkowski M., Goering R., Gomes A., Kikuchi K., Marchese A., Mato R., Melter O., Oliveira D., Palacio R., Sa-Leao R., Santos Sanches I., Song J. H., Tassios P. T. & Villari P.** - *Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains.* Microbial Drug Resistance. 2000, 6(3): 189-198.
50. **Stefani S., Chung D. R., Lindsay J. A., Friedrich A. W., Kearns A. M., Westh H. & Mackenzie F. M.** - *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods.* International Journal of Antimicrobial Agents. 2012, 39(4): 273-282.
51. **Feng Y., Chen C. J., Su L. H., Hu S., Yu J. & Chiu C. H.** - *Evolution and pathogenesis of Staphylococcus aureus: lessons learned from genotyping and comparative genomics.* FEMS Microbiology Reviews. 2008, 32(1): 23-37.
52. **Seybold U., Kourbatova E. V., Johnson J. G., Halvosa S. J., Wang Y. F., King M. D., Ray S. M. & Blumberg H. M.** - *Emergence of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections.* Clinical Infectious Diseases. 2006, 42(5): 647-656.



53. **Boyle-Vavra S., Ereshefsky B., Wang C. C. & Daum R. S.** - *Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) type VT or SCCmec type IV.* Journal of Clinical Microbiology. 2005, 43(9): 4719-4730.
54. **Reyes J., Rincon S., Diaz L., Panesso D., Contreras G. A., Zurita J., Carrillo C., Rizzi A., Guzman M., Adachi J., Chowdhury S., Murray B. E. & Arias C. A.** - *Dissemination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 sequence type 8 lineage in Latin America.* Clinical Infectious Diseases. 2009, 49(12): 1861-1867.
55. **Tsuji B. T., Rybak M. J., Cheung C. M., Amjad M. & Kaatz G. W.** - *Community- and health care-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a comparison of molecular epidemiology and antimicrobial activities of various agents.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2007, 58(1): 41-47.
56. **Mediavilla J. R., Chen L., Mathema B. & Kreiswirth B. N.** - *Global epidemiology of community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA).* Current Opinion in Microbiology. 2012, 15(5): 588-595.
57. **Tacconelli E., Venkataraman L., De Girolami P. C. & D'Agata E. M. C.** - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteraemia diagnosed at hospital admission: distinguishing between community-acquired versus healthcare-associated strains.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004, 53(3): 474-479.
58. **O'Brien F. G., Lim T. T., Chong F. N., Coombs G. W., Enright M. C., Robinson D. A., Monk A., Said-Salim B., Kreiswirth B. N. & Grubb W. B.** - *Diversity among community isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Australia.* Journal of Clinical Microbiology. 2004, 42(7): 3185-3190.
59. **Otter J. A. & French G. L.** - *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the case for a genotypic definition.* Journal of Hospital Infection. 2012, 81(3): 143-148.
60. **Williams R. E.** - *Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance.* Bacteriological Reviews. 1963, 27:56-71.
61. **Eriksen N. H. R., Espersen F., Rosdahl V. T. & Jensen K.** - *Carriage of Staphylococcus-Aureus among 104 Healthy-Persons during a 19-Month Period.* Epidemiology and Infection. 1995, 115(1): 51-60.
62. **Hu L., Umeda A., Kondo S. & Amako K.** - *Typing of Staphylococcus-Aureus Colonizing Human Nasal Carriers by Pulsed-Field Gel-Electrophoresis.* Journal of Medical Microbiology. 1995, 42(2): 127-132.
63. **Hanssen A. M., Kjeldsen G. & Sollid J. U.** - *Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant Staphylococcus aureus and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer?* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004, 48(1): 285-296.

64. **Nouwen J. L., Ott A., Kluytmans-Vandenbergh M. F. Q., Boelens H. A. M., Hofman A., van Belkum A. & Verbrugh H. A.** - *Predicting the Staphylococcus aureus nasal carrier state: Derivation and validation of a "culture rule"*. Clinical Infectious Diseases. 2004, 39(6): 806-811.
65. **Wielders C. L., Vriens M. R., Brisse S., de Graaf-Miltenburg L. A., Troelstra A., Fleer A., Schmitz F. J., Verhoef J. & Fluit A. C.** - *In-vivo transfer of mecA DNA to Staphylococcus aureus [corrected]*. Lancet. 2001, 357(9269): 1674-1675.
66. **EARS-Net-Database** - *Proportion of Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in participating countries in 2010*. [http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/map\\_reports.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/map_reports.aspx). 2012. (Accessed: 14.02.2012).
67. **Enright M. C., Robinson D. A., Randle G., Feil E. J., Grundmann H. & Spratt B. G.** - *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002, 99(11): 7687-7692.
68. **Robinson D. A. & Enright M. C.** - *Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003, 47(12): 3926-3934.
69. **Wichelhaus A. T., Schäfer V. & Brade V.** - *Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie*. Chemotherapie Journal. 2000, 9(2): 93-98.
70. **Mellmann A., Weniger T., Berssenbrugge C., Rothganger J., Sammeth M., Stoye J. & Harmsen D.** - *Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of Staphylococcus aureus populations based on spa polymorphisms*. BMC Microbiology. 2007, 798.
71. **Shopsin B., Gomez M., Montgomery S. O., Smith D. H., Waddington M., Dodge D. E., Bost D. A., Riehman M., Naidich S. & Kreiswirth B. N.** - *Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of Staphylococcus aureus strains*. Journal of Clinical Microbiology. 1999, 37(11): 3556-3563.
72. **Strommenger B., Kettlitz C., Weniger T., Harmsen D., Friedrich A. W. & Witte W.** - *Assignment of Staphylococcus isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing*. Journal of Clinical Microbiology. 2006, 44(7): 2533-2540.
73. **Zarrilli R., Di Popolo A., Bagattini M., Giannouli M., Martino D., Barchitta M., Quattrocchi A., Iula V. D., de Luca C., Scarcella A., Triassi M. & Agodi A.** - *Clonal spread and patient risk factors for acquisition of extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii in a neonatal intensive care unit in Italy*. Journal of Hospital Infection. 2012, 82(4): 260-265.

74. **Walker J., Borrow R., Edwards-Jones V., Oppenheim B. A. & Fox A. J.** - *Epidemiological characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in the North West of England by protein A (spa) and coagulase (coa) gene polymorphisms.* Epidemiology and Infection. 1998, 121(3): 507-514.
75. **Goering R. V. & Winters M. A.** - *Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis.* Journal of Clinical Microbiology. 1992, 30(3): 577-580.
76. **Trindade P. D., Pacheco R. L., Costa S. F., Rossi F., Barone A. A., Mamizuka E. M. & Levin A. S.** - *Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Journal of Clinical Microbiology. 2005, 43(7): 3435-3437.
77. **Schwartz D. C. & Cantor C. R.** - *Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.* Cell. 1984, 37(1): 67-75.
78. **Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H. & Swaminathan B.** - *Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel-Electrophoresis - Criteria for Bacterial Strain Typing.* Journal of Clinical Microbiology. 1995, 33(9): 2233-2239.
79. **Harris S. R., Feil E. J., Holden M. T., Quail M. A., Nickerson E. K., Chantratita N., Gardete S., Tavares A., Day N., Lindsay J. A., Edgeworth J. D., de Lencastre H., Parkhill J., Peacock S. J. & Bentley S. D.** - *Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread.* Science. 2010, 327(5964): 469-474.
80. **Krziwanek K., Luger C., Sammer B., Stumvoll S., Stammler M., Metz-Gercek S. & Mittermayer H.** - *PVL-positive MRSA in Austria.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2007, 26(12): 931-935.
81. **Linde H., Wagenlehner F., Strommenger B., Drubel I., Tanzer J., Reischl U., Raab U., Holler C., Naber K. G., Witte W., Hanses F., Salzberger B. & Lehn N.** - *Healthcare-associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leucocidin gene in southeastern Germany.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2005, 24(6): 419-422.
82. **Ostojic M.** - *Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).* Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. 2008, 8(3): 259-265.
83. **Tenover F. C., Gay E. A., Frye S., Eells S. J., Healy M. & McGowan J. E., Jr.** - *Comparison of typing results obtained for methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates with the DiversiLab system and pulsed-field gel electrophoresis.* Journal of Clinical Microbiology. 2009, 47(8): 2452-2457.
84. **Ichiyama S., Ohta M., Shimokata K., Kato N. & Takeuchi J.** - *Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Journal of Clinical Microbiology. 1991, 29(12): 2690-2695.

85. **Prevost G., Jaulhac B. & Piemont Y.** - *DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates.* Journal of Clinical Microbiology. 1992, 30(4): 967-973.
86. **Moodley A., Stegger M., Bagcigil A. F., Baptiste K. E., Loeffler A., Lloyd D. H., Williams N. J., Leonard N., Abbott Y., Skov R. & Guardabassi L.** - *spa typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006, 58(6): 1118-1123.
87. **Shore A. C., Rossney A. S., Kinnevey P. M., Brennan O. M., Creamer E., Sherlock O., Dolan A., Cunney R., Sullivan D. J., Goering R. V., Humphreys H. & Coleman D. C.** - *Enhanced discrimination of highly clonal ST22-methicillin-resistant Staphylococcus aureus IV isolates achieved by combining spa, dru, and pulsed-field gel electrophoresis typing data.* Journal of Clinical Microbiology. 2010, 48(5): 1839-1852.
88. **EUCAST** - *Staphylococcus aureus Calibration of zone diameter breakpoints to MIC values and/or resistance mechanism.* [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_criteria/S\\_aureus\\_2.0\\_December\\_2011.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_criteria/S_aureus_2.0_December_2011.pdf). 2011. (Accessed: 10.01.2012).
89. **Ridom** - *DNA Sequencing of the spa Gene.* [http://www.ridom.de/staphtype/spa\\_sequencing.shtml](http://www.ridom.de/staphtype/spa_sequencing.shtml). k. A. (Accessed: 12.12.2007).
90. **Microgen** - *Staphylococcus aureus NCTC 8325* [http://microgen.ouhsc.edu/s\\_aureus/s\\_aureus\\_home.htm](http://microgen.ouhsc.edu/s_aureus/s_aureus_home.htm). 2009. (Accessed: 10.09.2009).
91. **Invitrogen** - *SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain.* [probes.invitrogen.com/media/pis/mp11494.pdf](http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp11494.pdf). 2006.
92. **Applied-Maths** - *GelCompare® II Manual.* 2005.
93. **Sneath P. & Sokal R. R.** - *Numerical Taxonomy.* W. H. Freeman and Company. San Francisco. 1973.
94. **Sørensen T.** - *A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons.* Biologiske Skrifter / Kongelige Danske Videnskabernes Selskab. 1948.
95. **Lina G., Piemont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M. O., Gauduchon V., Vandenesch F. & Etienne J.** - *Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia.* Clinical Infectious Diseases. 1999, 29(5): 1128-1132.

96. **Karahan Z. C., Dolapci I. & Tekeli A.** - [Influence of reaction optimization on the results of PCR amplification of Panton-Valentine leukocidin genes among *Staphylococcus aureus* isolates]. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2009, 43(4): 519-528.
97. **Grundmann H., Aanensen D. M., van den Wijngaard C. C., Spratt B. G., Harmsen D., Friedrich A. W. & Reference E. S.** - *Geographic Distribution of Staphylococcus aureus Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis*. *Plos Medicine*. 2010, 7(1): e1000215.
98. **Huson D. H. & Bryant D.** - *Application of phylogenetic networks in evolutionary studies*. *Molecular Biology and Evolution*. 2006, 23(2): 254-267.
99. **Witte W., Strommenger B., Klare I. & Werner G.** - *Bakterielle Erreger von Krankenhausinfektionen mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen Teil I: Diagnostik und Typisierung*. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2004, 47(4): 352-362.
100. **Roberts R. B., de Lencastre A., Eisner W., Severina E. P., Shopsin B., Kreiswirth B. N. & Tomasz A.** - *Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in 12 New York hospitals. MRSA Collaborative Study Group*. *Journal of Infectious Diseases*. 1998, 178(1): 164-171.
101. **Tenover F. C., Arbeit R., Archer G., Biddle J., Byrne S., Goering R., Hancock G., Hebert G. A., Hill B., Hollis R., Jarvis W. R., Kreiswirth B., Eisner W., Maslow J., McDougal L. K., Miller J. M., Mulligan M. & Pfaller M. A.** - *Comparison of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of Staphylococcus-Aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994, 32(2): 407-415.
102. **Bosch T., de Neeling A. J., Schouls L. M., van der Zwaluw K. W., Kluytmans J. A., Grundmann H. & Huijsdens X. W.** - *PFGE diversity within the methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonal lineage ST398*. *BMC Microbiology*. 2010, 101-7.
103. **McDougal L. K., Steward C. D., Killgore G. E., Chaitram J. M., McAllister S. K. & Tenover F. C.** - *Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the United States: establishing a national database*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, 41(11): 5113-5120.
104. **Montesinos I., Salido E., Delgado T., Cuervo M. & Sierra A.** - *Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002, 40(6): 2119-2125.

105. **Murchan S., Kaufmann M. E., Deplano A., de Ryck R., Struelens M., Zinn C. E., Fussing V., Salmenlinna S., Vuopio-Varkila J., El Solh N., Cuny C., Witte W., Tassios P. T., Legakis N., van Leeuwen W., van Belkum A., Vindel A., Laconcha I., Garaizar J., Haeggman S., Olsson-Liljequist B., Ransjo U., Coombes G. & Cookson B.** - *Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains.* Journal of Clinical Microbiology. 2003, 41(4): 1574-1585.
106. **Haenni M., Saras E., Chatre P., Medaille C., Bes M., Madec J. Y. & Laurent F.** - *A USA300 variant and other human-related methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains infecting cats and dogs in France.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012, 67(2): 326-329.
107. **Tenover F. C., McDougal L. K., Goering R. V., Killgore G., Projan S. J., Patel J. B. & Dunman P. M.** - *Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus widely disseminated in the United States.* Journal of Clinical Microbiology. 2006, 44(1): 108-118.
108. **Cheung T. K., Chu Y. W., Chu M. Y., Tsang V. Y. & Lo J. Y.** - *Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the community in Hong Kong.* Journal of Medical Microbiology. 2008, 57(11): 1440-1443.
109. **Antri K., Rouzic N., Dauwalder O., Boubekri I., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Tazir M., Ramdani-Bouguessa N. & Etienne J.** - *High prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers.* Clinical Microbiology and Infection. 2011, 17(4): 526-532.
110. **Witte W., Braulke C., Cuny C., Strommenger B., Werner G., Heuck D., Jappe U., Wendt C., Linde H. J. & Harmsen D.** - *Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2005, 24(1): 1-5.
111. **Witte W., Cuny C., Strommenger B., Braulke C. & Heuck D.** - *Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany.* Euro Surveillance. 2004, 9(1): 16-18.
112. **Larsen A. R., Goering R., Stegger M., Lindsay J. A., Gould K. A., Hinds J., Sorum M., Westh H., Boye K. & Skov R.** - *Two distinct clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) with the same USA300 pulsed-field gel electrophoresis profile: a potential pitfall for identification of USA300 community-associated MRSA.* Journal of Clinical Microbiology. 2009, 47(11): 3765-3768.
113. **Stemper M. E., Brady J. M., Qutaishat S. S., Borlaug G., Reed J., Reed K. D. & Shukla S. K.** - *Shift in Staphylococcus aureus clone linked to an infected tattoo.* Emerging Infectious Diseases. 2006, 12(9): 1444-1446.

114. **Müller-Premru M., Strommenger B., Alikadic N., Witte W., Friedrich A. W., Seme K., Kucina N. S., Smrke D., Spik V. & Gubina M.** - *New strains of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus with Panton-Valentine leukocidin causing an outbreak of severe soft tissue infection in a football team.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2005, 24(12): 848-850.
115. **Hetem D. J., Westh H., Boye K., Jarlov J. O., Bonten M. J. & Bootsma M. C.** - *Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Danish Hospitals.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012, 67(7): 1775-1780.
116. **Coombs G. W., Monecke S., Ehricht R., Slickers P., Pearson J. C., Tan H. L., Christiansen K. J. & O'Brien F. G.** - *Differentiation of clonal complex 59 community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Western Australia.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010, 54(5): 1914-1921.
117. **Lee S. S., Kim Y. J., Chung D. R., Jung K. S. & Kim J. S.** - *Invasive infection caused by a community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain not carrying Panton-Valentine leukocidin in South Korea.* Journal of Clinical Microbiology. 2010, 48(1): 311-313.
118. **Said-Salim B., Mathema B. & Kreiswirth B. N.** - *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an emerging pathogen.* Infection Control and Hospital Epidemiology. 2003, 24(6): 451-455.
119. **Bartels M. D., Boye K., Rhod Larsen A., Skov R. & Westh H.** - *Rapid increase of genetically diverse methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Copenhagen, Denmark.* Emerging Infectious Diseases. 2007, 13(10): 1533-1540.
120. **Witte W., Strommenger B., Cuny C., Heuck D. & Nuebel U.** - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus containing the Panton-Valentine leukocidin gene in Germany in 2005 and 2006.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007, 60(6): 1258-1263.
121. **Ghebremedhin B., König W., Witte W., Hardy K. J., Hawkey P. M. & König B.** - *Subtyping of ST22-MRSA-IV (Barnim epidemic MRSA strain) at a university clinic in Germany from 2002 to 2005.* Journal of Medical Microbiology. 2007, 56(Pt 3): 365-375.
122. **Ellington M. J., Perry C., Ganner M., Warner M., McCormick Smith I., Hill R. L., Shallcross L., Sabersheikh S., Holmes A., Cookson B. D. & Kearns A. M.** - *Clinical and molecular epidemiology of ciprofloxacin-susceptible MRSA encoding PVL in England and Wales.* European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2009, 28(9): 1113-1121.
123. **Nadig S., Ramachandra Raju S. & Arakere G.** - *Epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus (EMRSA-15) variants detected in healthy and diseased individuals in India.* Journal of Medical Microbiology. 2010, 59(Pt 7): 815-821.

124. **Holmes A., Ganner M., McGuane S., Pitt T. L., Cookson B. D. & Kearns A. M.** - *Staphylococcus aureus* isolates carrying *Panton-Valentine leucocidin* genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005, 43(5): 2384-2390.
125. **O'Neill G. L., Murchan S., Gil-Setas A. & Aucken H. M.** - Identification and characterization of phage variants of a strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15). *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, 39(4): 1540-1548.
126. **Udo E. E., Al-Sweih N. & Noronha B.** - Characterisation of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (including EMRSA-15) in Kuwait Hospitals. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006, 12(3): 262-269.
127. **Chung M., Dickinson G., de Lencastre H. & Tomasz A.** - International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, 42(2): 542-547.
128. **Fenner L., Widmer A. F., Dangel M. & Frei R.** - Distribution of *spa* types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during a 6 year period at a low-prevalence university hospital. *Journal of Medical Microbiology*. 2008, 57(5): 612-616.
129. **Böhme C.** - *Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) bei Patienten und in der aquatischen Umwelt*. Dissertation. Johannes Gutenberg Universität, Mainz. 2012.
130. **Nübel U., Roumagnac P., Feldkamp M., Song J. H., Ko K. S., Huang Y. C., Coombs G., Ip M., Westh H., Skov R., Struelens M. J., Goering R. V., Strommenger B., Weller A., Witte W. & Achtman M.** - Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, 105(37): 14130-14135.
131. **Mellmann A., Weniger T., Berssenbrugge C., Keckevoet U., Friedrich A. W., Harmsen D. & Grundmann H.** - Characterization of clonal relatedness among the natural population of *Staphylococcus aureus* strains by using *spa* sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008, 46(8): 2805-2808.
132. **Nashev D., Toshkova K., Salasia S. I., Hassan A. A., Lammler C. & Zschock M.** - Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, 233(1): 45-52.
133. **Kurlenda J., Grinholc M. & Szweda P.** - Lack of correlation between *X* region *spa* polymorphism and virulence of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Acta Biochimica Polonica*. 2010, 57(1): 135-138.
134. **Todar K.** - *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>. 2008. (Accessed: 10.01.2012).



135. **Rozgonyi F., Kocsis E., Kristof K. & Nagy K.** - *Is MRSA more virulent than MSSA?* Clinical Microbiology and Infection. 2007, 13(9): 843-845.
136. **Touhami A., Jericho M. H. & Beveridge T. J.** - *Molecular recognition forces between immunoglobulin G and a surface protein adhesin on living Staphylococcus aureus.* Langmuir. 2007, 23(5): 2755-2760.
137. **Pirofski L. A. & Casadevall A.** - *Q and A: What is a pathogen? A question that begs the point.* BMC Biology. 2012, 106.
138. **Chen F. J., Lauderdale T. L., Huang I. W., Lo H. J., Lai J. F., Wang H. Y., Shiau Y. R., Chen P. C., Ito T. & Hiramatsu K.** - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Taiwan.* Emerging Infectious Diseases. 2005, 11(11): 1760-1763.
139. **Tristan A., Bes M., Meugnier H., Lina G., Bozdogan B., Courvalin P., Reverdy M. E., Enright M. C., Vandenesch F. & Etienne J.** - *Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus, 2006.* Emerging Infectious Diseases. 2007, 13(4): 594-600.
140. **Vandenesch F., Naimi T., Enright M. C., Lina G., Nimmo G. R., Heffernan H., Liassine N., Bes M., Greenland T., Reverdy M. E. & Etienne J.** - *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence.* Emerging Infectious Diseases. 2003, 9(8): 978-984.
141. **McCarthy N. L., Sullivan P. S., Gaynes R. & Rimland D.** - *Health care-associated and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: A comparison of definitions.* American Journal of Infection Control. 2010, 38(8): 600-606.
142. **Chavez T. T. & Decker C. F.** - *Health care-associated MRSA versus community-associated MRSA.* Disease a Month. 2008, 54(12): 763-768.
143. **Wannet W. J. B., Spalburg E., Heck M. E. O. C., Pluister G. N., Tiemersma E., Willems R. J. L., Huijsdens X. W., de Neeling A. J. & Etienne J.** - *Emergence of virulent methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains carrying Pantone-Valentine leukocidin genes in the Netherlands.* Journal of Clinical Microbiology. 2005, 43(7): 3341-3345.
144. **Mariem B. J., Ito T., Zhang M., Jin J., Li S., Ilhem B. B., Adnan H., Han X. & Hiramatsu K.** - *Molecular characterization of methicillin-resistant Pantone-valentine leukocidin positive staphylococcus aureus clones disseminating in Tunisian hospitals and in the community.* BMC Microbiology. 2013, 132.
145. **Diep B. A. & Otto M.** - *The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis.* Trends in Microbiology. 2008, 16(8): 361-369.

146. **Ellington M. J., Hope R., Ganner M., Ganner M., East C., Brick G. & Kearns A. M.** - *Is Panton-Valentine leucocidin associated with the pathogenesis of Staphylococcus aureus bacteraemia in the UK?* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007, 60(2): 402-405.
147. **Otto M.** - *Community-associated MRSA: a dangerous epidemic.* Future Microbiology. 2007, 2(5): 457-459.
148. **Voyich J. M., Otto M., Mathema B., Braughton K. R., Whitney A. R., Welty D., Long R. D., Dorward D. W., Gardner D. J., Lina G., Kreiswirth B. N. & DeLeo F. R.** - *Is panton-valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease?* Journal of Infectious Diseases. 2006, 194(12): 1761-1770.
149. **Peacock S. J., Moore C. E., Justice A., Kantzanou M., Story L., Mackie K., O'Neil G. & Day N. P. J.** - *Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of Staphylococcus aureus.* Infection and Immunity. 2002, 70(9): 4987-4996.
150. **Lin C. C., Wang J. L., Lin C. Y., Chen S. Y., Wang J. T., Wu K. D. & Chang S. C.** - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in patients with end-stage renal disease in Taiwan: distinguishing between community-associated and healthcare-associated strains.* Infection Control and Hospital Epidemiology. 2009, 30(1): 89-92.
151. **Park S. H., Park C., Yoo J. H., Choi S. M., Choi J. H., Shin H. H., Lee D. G., Lee S., Kim J., Choi S. E., Kwon Y. M. & Shin W. S.** - *Emergence of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains as a cause of healthcare-associated bloodstream infections in Korea.* Infection Control and Hospital Epidemiology. 2009, 30(2): 146-155.
152. **Wang J. T., Wang J. L., Fang C. T., Chie W. C., Lai M. S., Lauderdale T. L., Weng C. M. & Chang S. C.** - *Risk factors for mortality of nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) bloodstream infection: with investigation of the potential role of community-associated MRSA strains.* Journal of Infection. 2010, 61(6): 449-457.

**Anhang**

**Tabelle A 1** Darstellung der 20 häufigsten spa-Typen nach deren relativen globalen Vorkommensfrequenzen, mit Angabe aller Länder in denen der jeweilige spa-Typ bisher dokumentiert wurde, errechnet anhand des Dateneinganges auf dem Ridom SpaServer, Stand Oktober 2011.

spa-Typ	Frequenz	Länder in denen dieser spa-Typ dokumentiert wurde
t003	11,04 %	Belgien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Griechenland, Großbritannien, Kanada, Kroatien, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Schweden, Schweiz, Spanien, Tschechien, USA, Vereinigte Arabische Emirate
t032	10,10 %	Belgien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Island, Israel, Italien, Kanada, Libanon, Lichtenstein, Malaysia, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Schweden, Schweiz, Spanien, Südafrika, Tschechien, Ungarn
t002	6,03 %	Afghanistan, Argentinien, Belgien, Chile, China, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Gabun, Großbritannien, Island, Israel, Italien, Japan, Jordanien, Kroatien, Libanon, Martinique, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Rumänien, Schweden, Schweiz, Spanien, Südafrika, Taiwan, Tschechien, Ungarn, USA, Vereinigte Arabische Emirate, Zypern
t008	5,94 %	Argentinien, Australien, Belgien, Bulgarien, Chile, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Gabun, Großbritannien, Indien, Island, Israel, Italien, Japan, Jordanien, Kanada, Kroatien, Libanon, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Schweden, Schweiz, Slowakei, Südafrika, Spanien, Tschechien, Ungarn, USA, Vereinigte Arabische Emirate
t011	3,48 %	Belgien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Italien, Kroatien, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Schweden, Schweiz, Spanien, Tschechien
t084	1,74 %	Belgien, China, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Gabun, Großbritannien, Indonesien, Island, Italien, Jordanien, Libanon, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Schweden, Schweiz, Südafrika, Spanien, Taiwan, USA, Vereinigte Arabische Emirate
t127	1,67 %	Belgien, China, Dänemark, Deutschland, Elfenbeinküste, Finnland, Frankreich, Gabun, Griechenland, Großbritannien, Indonesien, Island, Israel, Kanada, Kroatien, Lettland, Libanon, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Rumänien, Schweden, Schweiz, Südafrika, Spanien, Taiwan, USA, Vereinigte Arabische Emirate, Zypern
t037	1,66 %	Argentinien, Australien, Belgien, Bulgarien, Chile, China, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Iran, Island, Israel, Italien, Jordanien, Kanada, Kroatien, Lettland, Libanon, Malaysia, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Schweden, Schweiz, Südafrika, Spanien, Taiwan, Tschechien, USA, Vereinigte Arabische Emirate
t012	1,62 %	Argentinien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Großbritannien, Island, Italien, Jordanien, Kanada, Lettland, Libanon, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Schweden, Schweiz, Südafrika, Spanien, Tschechien, USA, Zypern
t034	1,45 %	Belgien, China, Dänemark, Deutschland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Schweden, Schweiz, Tschechien, USA

## Anhang

spa-Typ	Frequenz	Länder in denen dieser spa-Typ dokumentiert wurde
t044	1,36 %	Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Großbritannien, Iran, Island, Italien, Jordanien, Kroatien, Libanon, Niederlande, Norwegen, Österreich, Schweden, Schweiz, Spanien, Tschechien, Ungarn, Vereinigte Arabische Emirate, Zypern,
t015	1,18 %	Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Großbritannien, Indonesien, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Rumänien, Schweden, Schweiz, Südafrika, Spanien, Taiwan, Tschechien, Ungarn, USA
t067	1,07 %	Argentinien, Belgien, Chile, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Großbritannien, Island, Israel, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Schweden, Schweiz, Spanien, Tschechien, USA
t019	1,02 %	Argentinien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Griechenland, Großbritannien, Island, Italien, Kanada, Kroatien, Lettland, Libanon, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Schweden, Schweiz, Spanien, Tschechien, USA, Vereinigte Arabische Emirate
t001	0,99 %	Belgien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Israel, Italien, Kroatien, Niederlande, Norwegen, Österreich, Schweden, Schweiz, Slowenien, Südafrika, Spanien, Tschechien, USA
t021	0,92 %	Argentinien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Großbritannien, Indien, Island, Italien, Jordanien, Lettland, Libanon, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Schweden, Schweiz, Südafrika, Spanien, USA, Vereinigte Arabische Emirate
t004	0,91 %	Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Großbritannien, Island, Israel, Niederlande, Norwegen, Österreich, Schweden, Schweiz, Spanien, Tschechien, USA
t091	0,88 %	Belgien, China, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Gabun, Griechenland, Großbritannien, Italien, Jordanien, Libanon, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Schweden, Schweiz, Spanien, Taiwan, Tschechien, USA
t018	0,84 %	Belgien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Island, Italien, Jordanien, Kanada, Niederlande, Neuseeland, Norwegen, Österreich, Schweden, Schweiz, Spanien, Südafrika, Tschechien, USA, Vereinigte Arabische Emirate
t045	0,79 %	Argentinien, Belgien, China, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Island, Israel, Japan, Kanada, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Schweden, Schweiz, Spanien, Südafrika, USA

Anhang

**Tabelle A 2** Übersicht über die spa-Typen, die jeweilige Isolatzahl und der prozentuale Anteil für alle 1114 Isolate des Mainzer Raums und differenziert in UMM und KKM.

spa-Typ	Raum Mainz		UMM		KKM	
	Anzahl	% von 1114	Anzahl	% von 762	Anzahl	% von 352
t001	8	0,72 %	6	0,79 %	2	0,57 %
t002	20	1,80 %	15	1,97 %	5	1,42 %
t003	840	75,40 %	565	74,15 %	275	78,13 %
t004	6	0,54 %	6	0,79 %	0	0,00 %
t005	2	0,18 %	2	0,26 %	0	0,00 %
t008	23	2,06 %	17	2,23 %	6	1,70 %
t014	17	1,53 %	11	1,44 %	6	1,70 %
t015	4	0,36 %	3	0,39 %	1	0,28 %
t018	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t019	4	0,36 %	4	0,52 %	0	0,00 %
t022	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t024	9	0,81 %	8	1,05 %	1	0,28 %
t025	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t027	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t032	53	4,76 %	32	4,20 %	21	5,97 %
t037	3	0,27 %	2	0,26 %	1	0,28 %
t044	7	0,63 %	6	0,79 %	1	0,28 %
t045	19	1,71 %	13	1,71 %	6	1,70 %
t050	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t078	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t088	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t091	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t127	5	0,45 %	4	0,52 %	1	0,28 %
t131	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t151	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t190	5	0,45 %	4	0,52 %	1	0,28 %
t264	6	0,54 %	6	0,79 %	0	0,00 %
t305	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t306	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t311	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t324	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t379	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %

Anhang

spa-Typ	Raum Mainz		UMM		KKM	
	Anzahl	% von 1114	Anzahl	% von 762	Anzahl	% von 352
t439	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t457	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t463	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t474	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t481	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t504	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t535	3	0,27 %	3	0,39 %	0	0,00 %
t564	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t575	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t608	8	0,72 %	5	0,66 %	3	0,85 %
t626	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t653	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t785	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t852	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t1007	8	0,72 %	5	0,66 %	3	0,85 %
t1018	16	1,44 %	16	2,10 %	0	0,00 %
t1028	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t1083	2	0,18 %	1	0,13 %	1	0,28 %
t1224	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t1247	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t1378	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t1814	2	0,18 %	0	0,00 %	2	0,57 %
t3195	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t3271	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t3948	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t4484	2	0,18 %	2	0,26 %	0	0,00 %
t7634	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t8038	3	0,27 %	0	0,00 %	3	0,85 %
t9607	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
t11182	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t11183	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
t11184	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %

## Anhang

**Tabelle A 3** Nach Jahren getrennte Auflistung aller Isolate deren spa-Typ  $\geq 1\%$  der Isolate der Gesamtuntersuchungsmenge an der UMM ausmacht. t003 wurde ausgelassen, da dieser spa-Typ mit  $> 70\%$  so häufig vorkommt, dass eine derartige Auswertung nicht sinnvoll ist. In den einzelnen Jahren wurden die Isolate nach den klinischen Bereichen geordnet, in welchen sie detektiert wurden. Die rot unterlegten Felder kennzeichnen Isolate, welche in ein und demselben klinischen Bereich, in einem engen zeitlichen Rahmen diagnostiziert wurden. Abkürzung: k.B. = klinischer Bereich.

spa-Typ	2004		2005		2006		2007		2008	
	KH-Nr.	k.B.	KH-Nr.	k.B.	KH-Nr.	k.B.	KH-Nr.	k.B.	KH-Nr.	k.B.
<b>t1018</b>	KH133/04	H	KH070/05	E	KH257/06	A	KH183/07	K2	KH759/08	A
	KH048/04	K1	KH060/05	K6	KH224/06	O6	KH027/07	P	KH646/08	O6
	KH108/04	P2	KH398/05	P						
			KH422/05	P1						
			KH346/05I	P2						
			KH312/05	P3						
			KH457/05	P3						
<b>t002</b>	KH383/04	F	KH337/05I	G	KH309/06	G	KH087/07	L	KH480/08	N
	KH346/04	N	KH426/05	G	KH406/06 PVL+	K3	KH576/07	O6	KH629/08	O7
	KH377/04	O20	KH535/05	Q						
	KH217/04	R1	KH254/05	Q1						
			KH433/05	Q1						
<b>t014</b>	KH312/04	P3	KH072/05	E	KH361/06	A	KH138/07	K5	KH253/08I	A
	KH446/04	P3	KH120/05	E	KH167/06	P2	KH140/07	P	KH022/08	O12
			KH085/05	K2						
<b>t024</b>	KH021/04	Q	KH380/05I	G	KH034/06	K3			KH053/08	P
			KH386/05I	G						
			KH399/05	G						
			KH446/05	G						
			KH066/05	H						
<b>t008</b>	KH456/04	O17	KH325/05	K2	KH490/06I caMRSA	G	KH135/07 caMRSA	K2	KH171/08 caMRSA	G
	KH127/04 caMRSA	O18	KH482/05 caMRSA	K3	KH495/06 caMRSA	G	KH054/07	O18	KH329/08 caMRSA	O7
	KH095/04 caMRSA	O6	KH543/05	K3	KH346/06	O7	KH185/07 caMRSA	O18		
	KH231/04	P2	KH239/05	O7	KH169/06	P2				

Anhang

spa-Typ	2004		2005		2006		2007		2008	
	KH-Nr.	k.B.	KH-Nr.	k.B.	KH-Nr.	k.B.	KH-Nr.	k.B.	KH-Nr.	k.B.
<b>t045</b>	KH382/04	I			KH533/06	G	KH344/07	G	KH465/08	G
	KH296/04	K3			KH225/06	O9	KH289/07	I	KH523/08	K1
	KH341/04	P2			KH189/06	P2	KH559/07I	O7	KH141/08	P3
							KH480/07	P2		
<b>t032</b>	KH039/04	K4	KH100/05	E	KH010/06	A	KH549/07	K7	KH686/08	F
	KH092/04	O5	KH377/05	G	KH400/06	G	KH046/07I	P	KH278/08	I
	KH213/04	P	KH052/05	H	KH489/06	K7	KH202/07	P	KH027/08	J
	KH186/04	R1	KH021/05	N	KH536/06	O7	KH585/07	P2	KH153/08	O9
			KH043/05	P	KH518/06	P	KH594/07	P2	KH688/08	P2
			KH317/05	P	KH082/06	P3	KH595/07	P2	KH440/08I	Q
			KH402/05I	Q1	KH432/06	P3	KH596/07	P2		
							KH600/07	P2		



**Tabelle A 4** Unterscheidung aller 64 spa-Typen (mit Angabe der jeweiligen Repeatanzahl) in Wund- und Haut-/Schleimhautabstriche für die 1114 untersuchten MRSA-Isolate des Mainzer Raums.

spa-Typisierung		Anzahl der Isolate aus dem Mainzer Raum					
spa-Typ	Repeatanzahl	Wunde (638)		Haut (476)		Gesamt (1114)	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
t001	10	5	0,78 %	3	0,63 %	8	0,72 %
t002	10	15	2,35 %	5	1,05 %	20	1,80 %
t003	8	485	76,02 %	355	74,58 %	840	75,40 %
t004	9	2	0,31 %	4	0,84 %	6	0,54 %
t005	12	0	0,00 %	2	0,42 %	2	0,18 %
t008	10	14	2,19 %	9	1,89 %	23	2,06 %
t014	9	5	0,78 %	12	2,52 %	17	1,53 %
t015	10	2	0,31 %	2	0,42 %	4	0,36 %
t018	11	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t019	8	3	0,47 %	1	0,21 %	4	0,36 %
t022	15	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t024	9	2	0,31 %	7	1,47 %	9	0,81 %
t025	15	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t027	3	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t032	16	22	3,45 %	31	6,51 %	53	4,76 %
t037	7	3	0,47 %	0	0,00 %	3	0,27 %
t044	7	7	1,10 %	0	0,00 %	7	0,63 %
t045	7	11	1,72 %	8	1,68 %	19	1,71 %
t050	10	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t078	9	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t088	11	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t091	10	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t127	7	1	0,16 %	4	0,84 %	5	0,45 %
t131	6	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t151	5	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t190	7	5	0,78 %	0	0,00 %	5	0,45 %
t264	7	4	0,63 %	2	0,42 %	6	0,54 %
t305	11	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t306	11	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t311	9	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t324	10	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %

Anhang

spa-Typisierung		Anzahl der Isolate aus dem Mainzer Raum					
spa-Typ	Repeatanzahl	Wunde (638)		Haut/Schleimhaut (476)		Gesamt (1114)	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
t379	13	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t439	6	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t457	4	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t463	4	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t474	10	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t481	9	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t504	5	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t535	3	3	0,47 %	0	0,00 %	3	0,27 %
t564	5	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t575	7	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t608	10	3	0,47 %	5	1,05 %	8	0,72 %
t626	9	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t653	5	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t785	17	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t852	12	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t1007	4	6	0,94 %	2	0,42 %	8	0,72 %
t1018	8	10	1,57 %	6	1,26 %	16	1,44 %
t1028	4	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t1083	6	2	0,31 %	0	0,00 %	2	0,18 %
t1224	6	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t1247	6	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t1378	17	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t1814	9	1	0,16 %	1	0,21 %	2	0,18 %
t3195	9	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t3271	7	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t3948	5	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t4484	9	2	0,31 %	0	0,00 %	2	0,18 %
t7634	6	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t8038	8	0	0,00 %	3	0,63 %	3	0,27 %
t9607	9	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t11183	10	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %
t11184	8	0	0,00 %	1	0,21 %	1	0,09 %
t11182	8	1	0,16 %	0	0,00 %	1	0,09 %

Anhang

**Tabelle A 5** Übersicht über die PFGE-Gruppen, deren Isolatanzahl und prozentuale Anteile für alle 1114 Isolate des Mainzer Raums und differenziert in UMM und KKM.

PFGE-Gruppe	Raum Mainz		UMM		KKM	
	Anzahl	% von 1114	Anzahl	% von 762	Anzahl	% von 352
I1	2	0,18 %	0	0,00 %	2	0,57 %
II1	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
III1	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
IV1	2	0,18 %	1	0,13 %	1	0,28 %
IV2	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
IV3	2	0,18 %	2	0,26 %	0	0,00 %
V1	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
VI1	416	37,34 %	301	39,50 %	115	32,67 %
VI2	27	2,42 %	19	2,49 %	8	2,27 %
VI3	130	11,67 %	89	11,68 %	41	11,65 %
VI4	11	0,99 %	9	1,18 %	2	0,57 %
VI5	5	0,45 %	4	0,52 %	1	0,28 %
VI6	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
VI7	2	0,18 %	1	0,13 %	1	0,28 %
VI8	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
VI9	7	0,63 %	7	0,92 %	0	0,00 %
VI10	124	11,13 %	85	11,15 %	39	11,08 %
VI11	9	0,81 %	8	1,05 %	1	0,28 %
VI12	2	0,18 %	0	0,00 %	2	0,57 %
VI13	13	1,17 %	7	0,92 %	6	1,70 %
VI14	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
VI15	7	0,63 %	2	0,26 %	5	1,42 %
VI16	44	3,95 %	29	3,81 %	15	4,26 %
VI17	9	0,81 %	5	0,66 %	4	1,14 %
VI18	2	0,18 %	1	0,13 %	1	0,28 %
VI19	3	0,27 %	2	0,26 %	1	0,28 %
VI20	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
VI21	75	6,73 %	36	4,72 %	39	11,08 %
VI22	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
VI23	4	0,36 %	4	0,52 %	0	0,00 %
VI24	3	0,27 %	3	0,39 %	0	0,00 %
VI25	5	0,45 %	4	0,52 %	1	0,28 %

Anhang

PFGE-Gruppe	Raum Mainz		UMM		KKM	
	Anzahl	% von 1114	Anzahl	% von 762	Anzahl	% von 352
VI26	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
VI27	14	1,26 %	10	1,31 %	4	1,14 %
VI28	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
VI29	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
VII1	3	0,27 %	2	0,26 %	1	0,28 %
VII2	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
VII3	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
VIII1	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
VIII2	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
IX1	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
IX2	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
IX3	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
X1	4	0,36 %	2	0,26 %	2	0,57 %
X2	8	0,72 %	4	0,52 %	4	1,14 %
X3	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
XI1	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
XII1	4	0,36 %	1	0,13 %	3	0,85 %
XII2	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
XII3	3	0,27 %	2	0,26 %	1	0,28 %
XII4	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
XII5	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
XIII1	3	0,27 %	1	0,13 %	2	0,57 %
XIII2	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
XIII3	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
XIV1	4	0,36 %	2	0,26 %	2	0,57 %
XIV2	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
XV1	6	0,54 %	3	0,39 %	3	0,85 %
XV2	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
XVI1	2	0,18 %	2	0,26 %	0	0,00 %
XVII1	2	0,18 %	2	0,26 %	0	0,00 %
XVII2	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
XVIII1	2	0,18 %	2	0,26 %	0	0,00 %
XVIII2	6	0,54 %	4	0,52 %	2	0,57 %
XVIII3	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %

Anhang

PFGE-Gruppe	Raum Mainz		UMM		KKM	
	Anzahl	% von 1114	Anzahl	% von 762	Anzahl	% von 352
<b>XIX1</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XX1</b>	5	0,45 %	5	0,66 %	0	0,00 %
<b>XX2</b>	6	0,54 %	4	0,52 %	2	0,57 %
<b>XX3</b>	2	0,18 %	2	0,26 %	0	0,00 %
<b>XXI1</b>	5	0,45 %	4	0,52 %	1	0,28 %
<b>XXII1</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXII2</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXIII1</b>	2	0,18 %	2	0,26 %	0	0,00 %
<b>XXIII2</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXIV1</b>	2	0,18 %	1	0,13 %	1	0,28 %
<b>XXV1</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXVI1</b>	2	0,18 %	2	0,26 %	0	0,00 %
<b>XXVI2</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXVII1</b>	4	0,36 %	4	0,52 %	0	0,00 %
<b>XXVIII1</b>	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
<b>XXIX1</b>	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
<b>XXX1</b>	35	3,14 %	21	2,76 %	14	3,98 %
<b>XXX2</b>	7	0,63 %	6	0,79 %	1	0,28 %
<b>XXX3</b>	2	0,18 %	2	0,26 %	0	0,00 %
<b>XXX4</b>	14	1,26 %	5	0,66 %	9	2,56 %
<b>XXX5</b>	3	0,27 %	3	0,39 %	0	0,00 %
<b>XXX6</b>	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
<b>XXXI1</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXXII1</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXXIII1</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXXIV1</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXXIV2</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXXIV3</b>	1	0,09 %	0	0,00 %	1	0,28 %
<b>XXXIV4</b>	2	0,18 %	0	0,00 %	2	0,57 %
<b>XXXIV5</b>	1	0,09 %	1	0,13 %	0	0,00 %
<b>XXXV1</b>	4	0,36 %	4	0,52 %	0	0,00 %
<b>XXXVI1</b>	6	0,54 %	5	0,66 %	1	0,28 %
<b>XXXVI2</b>	2	0,18 %	1	0,13 %	1	0,28 %

Anhang

**Tabelle A 6** Detaillierte Ansicht der möglichen genetischen Events innerhalb der spa-CCs. Für Insertionen, Deletionen und Substitutionen sind die am wahrscheinlichsten betroffenen Repeats bzw. Stellen (-) rot markiert.

	spa-Typ	Repeats
<b>Gründer des spa-CC002</b>	<b>t002</b>	<b>26-23-17-34-17-20-17-12-17-16</b>
<b>Deletion</b>	t311	26-23-17-34-20-17-12-17-16
<b>Substitution</b>	t001	26-30-17-34-17-20-17-12-17-16
<b>Gründer des spa-CC003</b>	<b>t003</b>	<b>26-17-20-17-12-17-17-16</b>
<b>Insertion</b>	t014	26-17-20-17-12-17-17-17-16
	t481	26-17-20-17-12-12-17-17-16
	t626	26-17-20-17-12-17-17-16-16
	t3195	26-17-20-17-17-12-17-17-16
<b>Deletion</b>	t045	26-17-20-17-12-17-16
	t151	26-17-20-17-16
	t264	26-17-20-17-17-17-16
	t463	26-17-17-16
	t504	26-17-20-17-12-
	t535	26-17-16
	t564	26-17-17-17-16
	t1007	26-17-20-17-
	t3948	26-12-17-17-16
<b>Substitution</b>	t1018	26-17-92-17-12-17-17-16
<b>mehrere Events</b>	t027	26-17-13
	t457	08-17-17-16
	t1083	14-17-12-17-17-16
	t1224	26-17-13-17-17-16
	t3271	26-17-92-17-12-17-16
	t7634	35-17-12-17-17-16
	t11182	26-17-20-17-17-16-17-16
<b>Gründer des spa-CC005</b>	<b>t005</b>	<b>26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28</b>
<b>Deletion</b>	t474	26-23-13-23-31-05-17-25-16-28
<b>mehrere Events</b>	t852	07-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28
	t022	26-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
	t032	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
	t1378	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-16-28

Anhang

	spa-Typ	Repeats
<b>Gründer des spa-CC024</b>	<b>t024</b>	<b>11-12-21-17-34-24-34-22-25</b>
<b>Insertion</b>	t008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
	t305	11-12-21-17-34-24-34-24-34-22-25
<b>Deletion</b>	t190	11-17-34-24-34-22-25
<b>unabhängige Typen</b>		
	t004	09-02-16-13-13-17-34-16-34
	t015	08-16-02-16-34-13-17-34-16-34
	t018	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24-24
	t019	08-16-02-16-02-25-17-24
	t037	15-12-16-02-25-17-24
	t044	07-23-12-34-34-33-34
	t078	04-21-12-41-20-17-12-12-17
	t091	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23
	t127	07-23-21-16-34-33-13
	t324	07-23-12-12-17-20-17-12-12-17
	t608	26-23-31-29-17-25-17-25-16-28
	t1028	07-34-33-34
	t4484	26-23-17-17-20-17-12-17-34
	t11183	11-19-19-12-21-17-34-24-02-25

## Anhang

**Tabelle A 7** Übersicht über alle an der UMM nachgewiesenen PFGE-Gruppen. Angegeben sind die Anzahl/Prozent an Isolaten die in diese Gruppe fallen, die spa-Typen (inklusive Häufigkeit) und die ermittelten spa-CC für alle spa-Typen einer PFGE-Gruppe.

Dendrogrammgruppe mit Anzahl & Prozent		Anzahl spa-Typen	spa-CC
<b>III</b>	1 (0,13 %)	1xt1028	unabhängiger Typ
<b>III1</b>	1 (0,13 %)	1xt535	spa-CC003
<b>IV1</b>	1 (0,13 %)	1xt127	unabhängiger Typ
<b>IV2</b>	1 (0,13 %)	1xt127	unabhängiger Typ
<b>IV3</b>	2 (0,26 %)	2xt127	unabhängiger Typ
<b>V1</b>	1 (0,13 %)	1xt078	unabhängiger Typ
<b>VI1</b>	301 (39,50 %)	255xt003, 13xt1018, 9xt002, 6xt045, 5xt014, 3xt264, 2xt1007, 1xt027, 1xt1083, 1xt3195, 1xt3271, 1xt463, 1xt481, 1xt626, 1xt11182, 1xt7634	spa-CC003, spa-CC002
<b>VI2</b>	19 (2,49 %)	18xt003, 1xt4484	spa-CC003, unabhängiger Typ
<b>VI3</b>	89 (11,68 %)	82xt003, 2xt1018, 1xt002, 1xt014, 1xt3948, 1xt535, 1xt608	spa-CC003, spa-CC002, unabhängiger Typ
<b>VI4</b>	9 (1,18 %)	8xt003, 1xt564	spa-CC003
<b>VI5</b>	4 (0,52 %)	3xt003, 1xt535	spa-CC003
<b>VI6</b>	1 (0,13 %)	1xt045	spa-CC003
<b>VI7</b>	1 (0,13 %)	1xt002	spa-CC002
<b>VI8</b>	1 (0,13 %)	1xt002	spa-CC002
<b>VI9</b>	7 (0,92 %)	5xt003, 2xt002	spa-CC003, spa-CC002
<b>VI10</b>	85 (11,15 %)	75xt003, 5xt045, 1xt002, 1xt1018, 1xt1224, 1xt151, 1xt264	spa-CC003, spa-CC002
<b>VI11</b>	8 (1,05 %)	7xt003, 1xt457	spa-CC003
<b>VI13</b>	7 (0,92 %)	7xt003	spa-CC003
<b>VI15</b>	2 (0,26 %)	2xt003	spa-CC003
<b>VI16</b>	29 (3,81 %)	25xt003, 2xt014, 1xt045, 1xt504	spa-CC003
<b>VI17</b>	5 (0,66 %)	4xt003, 1xt014	spa-CC003
<b>VI18</b>	1 (0,13 %)	1xt1018	spa-CC003
<b>VI19</b>	2 (0,26 %)	2xt003	spa-CC003
<b>VI20</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>VI21</b>	36 (4,72 %)	32xt003, 2xt1007, 2xt264	spa-CC003
<b>VI22</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>VI23</b>	4 (0,52 %)	4xt003	spa-CC003
<b>VI24</b>	3 (0,39 %)	3xt003	spa-CC003



Anhang

Dendrogrammgruppe mit Anzahl und Prozent		Anzahl spa-Typen	spa-CC
<b>VI25</b>	4 (0,52 %)	3xt003, 1xt014	spa-CC003
<b>VI27</b>	10 (1,31 %)	9xt003, 1xt1007	spa-CC003
<b>VI29</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>VII1</b>	2 (0,26 %)	2xt003	spa-CC003
<b>VII2</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>VII3</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>VIII1</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>VIII2</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>X1</b>	2 (0,26 %)	2xt003	spa-CC003
<b>X2</b>	4 (0,52 %)	3xt003, 1xt014	spa-CC003
<b>X3</b>	1 (0,13 %)	1xt4484	unabhängiger Typ
<b>XI1</b>	1 (0,13 %)	1xt311	spa-CC002
<b>XII1</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>XII2</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>XII3</b>	2 (0,26 %)	2xt003	spa-CC003
<b>XII4</b>	1 (0,13 %)	1xt091	unabhängiger Typ
<b>XII5</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>XIII2</b>	1 (0,13 %)	1xt001	spa-CC002
<b>XIII3</b>	1 (0,13 %)	1xt001	spa-CC002
<b>XIV1</b>	2 (0,26 %)	2xt001	spa-CC002
<b>XIV2</b>	1 (0,13 %)	1xt001	spa-CC002
<b>XV1</b>	3 (0,39 %)	2xt008, 1xt024	spa-CC024
<b>XV2</b>	1 (0,13 %)	1xt008	spa-CC024
<b>XVI1</b>	2 (0,26 %)	2xt004	unabhängiger Typ
<b>XVII1</b>	2 (0,26 %)	1xt608, 1xt001	unabhängiger Typ, spa-CC002
<b>XVII2</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>XVIII1</b>	2 (0,26 %)	2xt008	spa-CC024
<b>XVIII2</b>	4 (0,52 %)	4xt008	spa-CC024
<b>XVIII3</b>	1 (0,13 %)	1xt008	spa-CC024
<b>XIX1</b>	1 (0,13 %)	1xt324	unabhängiger Typ
<b>XX1</b>	5 (0,66 %)	5xt024	spa-CC024
<b>XX2</b>	4 (0,52 %)	2xt024, 1xt008, 1xt1183	spa-CC024, unabhängiger Typ

## Anhang

Dendrogrammgruppe mit Anzahl und Prozent		Anzahl spa-Typen	spa-CC
<b>XX3</b>	2 (0,26 %)	2xt008	spa-CC024
<b>XXI1</b>	4 (0,52 %)	4xt190	spa-CC024
<b>XXIII1</b>	1 (0,13 %)	1xt008	spa-CC024
<b>XXII2</b>	1 (0,13 %)	1xt008	spa-CC024
<b>XXIII1</b>	2 (0,26 %)	2xt008	spa-CC024
<b>XXIII2</b>	1 (0,13 %)	1xt037	unabhängiger Typ
<b>XXIV1</b>	1 (0,13 %)	1xt037	unabhängiger Typ
<b>XXV1</b>	1 (0,13 %)	1xt003	spa-CC003
<b>XXVI1</b>	2 (0,26 %)	2xt015	unabhängiger Typ
<b>XXVI2</b>	1 (0,13 %)	1xt015	unabhängiger Typ
<b>XXVII1</b>	4 (0,52 %)	4xt004	unabhängiger Typ
<b>XXX1</b>	21 (2,76 %)	19xt032, 1xt474, 1xt1378	spa-CC005
<b>XXX2</b>	6 (0,79 %)	5xt032, 1xt022	spa-CC005
<b>XXX3</b>	2 (0,26 %)	2xt005	spa-CC005
<b>XXX4</b>	5 (0,66 %)	4xt032, 1xt852	spa-CC005
<b>XXX5</b>	3 (0,39 %)	3xt032	spa-CC005
<b>XXXI1</b>	1 (0,13 %)	1xt032	spa-CC005
<b>XXXII1</b>	1 (0,13 %)	1xt018	unabhängiger Typ
<b>XXXIII1</b>	1 (0,13 %)	1xt305	spa-CC024
<b>XXXIV1</b>	1 (0,13 %)	1xt608	unabhängiger Typ
<b>XXXIV2</b>	1 (0,13 %)	1xt608	unabhängiger Typ
<b>XXXIV5</b>	1 (0,13 %)	1xt608	unabhängiger Typ
<b>XXXV1</b>	4 (0,52 %)	4xt019	unabhängiger Typ
<b>XXXVI1</b>	5 (0,66 %)	5xt044	unabhängiger Typ
<b>XXXVI2</b>	1 (0,13 %)	1xt044	unabhängiger Typ

Anhang

**Tabelle A 8** Ergebnisse der Resistenztestung für alle 45 PVL-positiven MRSA der UMM, sortiert nach den spa-Typen (KH-Nr. = Krankenhaushygiene Einfriernummer des jeweiligen Isolates).

KH-Nr.	spa-Typ	P	E	CL	LVX	FOX	GM	SXT	RA	TE	TEC	LZD	VA	FA
406/06	t002	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
238/06	t003	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
043/04		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
059/04		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
088/05		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
136/07		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
169/04		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
199/07		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
224/04		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
226/06		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
228/04		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
228/07		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
268/04		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
304/07		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
342/04		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
359/06		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
403/06		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
404/05		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
448/04		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
237/05		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
479/05		R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
764/08	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	
135/07	t008	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
490/06		R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
329/08		R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
495/06		R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
482/05		R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
127/04		R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
171/08		R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
185/07		R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
095/04		R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
074/08		t019	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
267/07	R		S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S

Anhang

KH-Nr.	spa-Typ	P	E	CL	LVX	FOX	GM	SXT	RA	TE	TEC	LZD	VA	FA
483/07	t019	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
504/05		R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
336/05	t044	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
351/08		R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
393/04		R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
616/08		R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
297/05		R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
467/08		R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
206/08		t474	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
261/07	t852	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
612/08	t7634	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
497/07	t3948	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R

## **Vorveröffentlichung der Ergebnisse**

- ❖ **Süß H., Kohnen W., Jansen B.** - *Wie wichtig ist PVL für die caMRSA Diagnostik und Bewertung?* 11. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene e.V. 2012 (DGKH), Berlin, Deutschland, 25.-28. März 2012 (Vortrag).
  
- ❖ **Süß H., Kohnen W., Jansen B.** - *Identification of classical pvl positive caMRSA with diagnostic methods based on a local German university clinic.* 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Hamburg, Deutschland, 30. September-03. Oktober 2012 (Poster).

*Danksagung*

**Danksagung**

*Lebenslauf*

**Lebenslauf**

