

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters -

**Charakterisierung von nosokomial und ambulant erworbenen Methicillin-
resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen aus Deutschland, 2010-2011**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Laura Richter
geboren in Breisach am Rhein

2014

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karsten Becker

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Dr. PH Frank Kipp

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für medizinische Mikrobiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Peters
Referent: Prof. Dr. med. Karsten Becker
Koreferent: PD Dr. med. Dr. PH Frank Kipp

ZUSAMMENFASSUNG

Charakterisierung von nosokomial und ambulant erworbenen Methicillin-resistenten
Staphylococcus aureus-Stämmen aus Deutschland, 2010-2011
Richter, Laura

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme galten lange als rein nosokomiale Infektionserreger („hospital-acquired“ = HA-MRSA), breiteten sich jedoch in den letzten Jahren auch außerhalb von Gesundheitseinrichtungen („community-associated“ = CA-MRSA) und bei Personen mit Kontakt zur Viehzucht („livestock-associated“ = LA-MRSA) aus. Repräsentativ erhobene Daten zur klonalen Struktur der in Deutschland vorkommenden MRSA-Stämme fehlten bisher. In dieser Studie wurde daher die aktuelle Epidemiologie, die genetischen Hintergründe und die Ausstattung mit Genen für Virulenzfaktoren von MRSA-Isolaten aus dem Jahr 2010 untersucht und ausgewertet.

An der Studie nahmen deutschlandweit 33 mikrobiologische Laboratorien mit Einsendungen aus dem ambulanten und/oder stationären Bereich teil. Jedes Labor sammelte konsekutiv bis zu 50 MRSA-Isolate von symptomatischen und asymptomatischen Patienten und sandte diese zur weiteren Charakterisierung an das Studienzentrum Münster. Pro Patient wurde maximal ein Isolat in die Studie eingeschlossen, außerdem wurden für jedes Isolat klinische Daten mithilfe eines standardisierten Fragebogens erhoben.

Die Spezieszugehörigkeit und die *mecA*- bzw. *mecC*-kodierte Methicillin-Resistenz der *S.aureus*-Isolate wurden molekulargenetisch mittels PCR-Verfahren gesichert und die Ausstattung mit Genen für Virulenzfaktoren (pyrogene Superantigene, Leukozidine) bestimmt. Zur Genotypisierung der insgesamt 1603 Isolate wurde die sequenzbasierte *S. aureus* Protein A (*spa*)-Typisierung eingesetzt. Es konnten 236 *spa*-Typen unterschieden werden, am häufigsten waren die klassischen HA-MRSA-Typen t003 (40,0%; n=639) und t032 (15,5%; n=249). In Süd- und Westdeutschland dominierte der *spa*-Typ t003, im Osten und Norden Deutschlands vor allem t032 und in Mitteldeutschland t034 und t011.

Panton-Valentine-Leukozidin (PVL)-positive Stämme (CA-MRSA) machten 2,7% (n=44) aller Isolate aus, wobei höhere Anteile in Hamburg (6,1%; n=6/99) und Frankfurt am Main (8,8%; n=4/45) auffielen. Sie traten häufiger bei symptomatischen als bei klinisch unauffälligen Patienten auf und waren insbesondere mit Abszessen assoziiert.

Mit MLST ST398 assoziierte LA-MRSA-Stämme (*spa*-Typ t011, t034 und verwandte *spa*-Typen) kamen deutschlandweit vor (1,9%; n=27/1456), besonders häufig jedoch in viehzuchtreichen Teilen Nordrhein-Westfalens und Niedersachsens, wo sie 40,1% (n=59/147) der eingesandten Isolate ausmachten.

Neben den wenigen dominierenden klonalen MRSA-Linien existiert eine Vielfalt verschiedener *spa*-Typen. Die klassischen HA-MRSA-Stämme machen weiterhin den Hauptanteil der MRSA-Population in Deutschland aus, jedoch finden sich, insbesondere in Schwerpunktregionen, auch wesentliche Anteile von CA-MRSA und LA-MRSA.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2014

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Charakterisierung von nosokomial und ambulant erworbenen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen aus Deutschland, 2010-2011

in dem Institut für medizinische Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Anleitung von:

Prof. Dr. med. Karsten Becker

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter der Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung in einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Münster, 06.05.2014

Laura Richter

Unterschrift

INHALT

1	Einleitung	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2	Virulenzfaktoren	2
1.2.1	Porenbildende Toxine	2
1.2.2	pyrogene Superantigene (SAGs).....	2
1.2.3	Exfoliativtoxine	3
1.2.4	epidermale Zelldifferenzierungs-Inhibitoren (EDIN)	3
1.3	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.3.1	Antibiotika-Resistenz	4
1.3.2	MRSA.....	4
1.3.3	hospital-acquired MRSA (HA-MRSA)	5
1.3.4	community-associated MRSA (CA-MRSA)	6
1.3.5	livestock-associated MRSA (LA-MRSA)	7
1.4	Typisierungsmethoden für MRSA	9
1.4.1	Pulsfeld Gelelektrophorese	9
1.4.2	Multilocus Sequenztypisierung	9
1.4.3	<i>spa</i> -Typisierung.....	10
1.4.4	Bestimmung der <i>agr</i> -Subtypen	10
1.5	Arbeitsaufgabe	11
2	Material und Methode	13
2.1	Studienaufbau	13
2.2	Epidemiologische und klinische Datenerhebung.....	13
2.3	Molekulare Charakterisierung.....	16
2.4	Nachweis des Protein A-Gens mittels <i>spa</i> -Typisierung.....	17
2.4.1	DNA-Isolation	17
2.4.2	PCR-Programm zur Amplifikation des <i>spa</i> -Gens	17
2.4.3	Agarosegelelektrophorese.....	19
2.4.4	Aufreinigung des PCR-Produktes mit EXOSAP	19
2.4.5	DNA-Sequenzierung	19
2.5	Multilocus Sequenztypisierung	20

2.6	Statistik.....	20
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Demographische Daten.....	22
3.1.1	Studienaufbau.....	22
3.1.2	Stationäre und ambulante Versorgung der Patienten.....	22
3.1.3	Materialverteilung.....	22
3.1.4	Assoziation der MRSA-Isolate mit Infektionen.....	23
3.1.5	Grunderkrankungen der Patienten.....	24
3.1.6	Anamnestische Risikofaktoren für den nosokomialen MRSA-Erwerb.....	25
3.1.7	Antibiotikatherapien zur Zeit des MRSA-Nachweises.....	27
3.2	Molekulare Ergebnisse.....	28
3.2.1	Ergebnisse der <i>spa</i> -Typisierung.....	28
3.2.2	Regionale Unterschiede in der <i>spa</i> -Typisierung.....	35
3.2.3	Verteilung der <i>spa</i> -Typen nach Risikofaktoren.....	39
3.2.4	Assoziation von <i>spa</i> -Typen mit klinisch relevanten Infektionen.....	39
3.3	Charakterisierung der MRSA-Exoproteine.....	40
3.3.1	Vorkommen von Virulenzfaktoren.....	40
3.3.2	Exotoxingene und Assoziation mit Infektion.....	43
3.4	<i>spa</i> -Typisierung und Virulenzfaktoren.....	43
3.4.1	Enterotoxingene nach <i>spa</i> -CCs und <i>spa</i> -Typen.....	43
3.4.2	<i>spa</i> -Typen der <i>etd</i> - und <i>edin-B</i> -positiven Isolate.....	44
3.4.3	<i>spa</i> -Typen und das Gen für das „toxic shock syndrome“ Toxin (TSST) ..	45
3.5	<i>agr</i> -Subtypen.....	45
3.5.1	Assoziation von <i>spa</i> -Typen mit <i>agr</i> -Subtypen.....	45
3.5.2	Assoziation von Toxingenen mit <i>agr</i> -Subtypen.....	46
3.6	PVL-positive MRSA (CA-MRSA).....	47
3.7	HA-MRSA.....	51
3.8	LA-MRSA.....	52
3.8.1	LA-MRSA bei Patienten mit Nutz- und Haustierhaltung.....	54
4	Diskussion.....	55
4.1	Bedeutung und Einordnung der Studie.....	55
4.2	Epidemiologie.....	56

4.2.1	Demographische Daten.....	56
4.2.2	ambulante und stationäre Versorgung der Patienten.....	56
4.2.3	MRSA und Assoziation mit Infektionen.....	57
4.2.4	Antibiotikatherapien vor MRSA-Nachweis	57
4.3	Molekulare Ergebnisse	58
4.3.1	<i>mec</i> -Ergebnisse	58
4.3.2	Ergebnisse der <i>spa</i> -Typisierung.....	58
4.3.3	Regionale Häufungen bestimmter <i>spa</i> -Typen.....	59
4.4	Toxingenprofil der MRSA-Stämme	60
4.4.1	Enterotoxingene	60
4.4.2	Enterotoxingene und Assoziation mit Infektion	61
4.4.3	Weitere Toxingene und Assoziation mit Infektion	61
4.4.4	Exotoxingene im Zusammenhang mit <i>spa</i> -Typen und <i>agr</i> -Subtypen.....	62
4.5	CA-MRSA.....	64
4.5.1	Molekulare Eigenschaften von CA-MRSA	65
4.6	HA-MRSA.....	65
4.7	LA-MRSA	66
4.7.1	geographische Verteilung.....	66
4.7.2	epidemiologische und klinische Daten.....	67
4.8	Einschränkungen der Studie.....	68
5	Zusammenfassung.....	69
6	Danksagung.....	71
7	Lebenslauf	73
8	Abkürzungsverzeichnis	74
9	Abbildungsverzeichnis	77
10	Tabellenverzeichnis	79
11	Literaturverzeichnis	80

1 EINLEITUNG

1.1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus ist ein fakultativ pathogenes, gram-positives Kokkenbakterium, das weltweit zu den häufigsten Infektionserregern gehört (Deurenberg & Stobberingh, 2008). Erstmals wurde es 1880 von Sir Alexander Ogston beschrieben. Er hatte Eiterpräparate von Patienten mit postoperativen Wundinfektionen und Abszessen mikroskopisch untersucht und dabei traubenähnlich angeordnete Bakterien entdeckt. Wegen ihrer Form nannte er sie *Staphylococcus*, abgeleitet von dem griechischen Wort „*staphyle*“ für Weintraube (Ogston, 1880). Im Jahre 1884 züchtete Rosenbach dieses Bakterium erstmals an und fügte auf Grund der goldenen Farbe seiner Kolonien die Bezeichnung „*aureus*“ hinzu (Van Belkum et al., 2009).

Von *S. aureus* verursachte Erkrankungen umfassen die Haut- und Weichgewebe-Infektion, postoperative Wundinfektion, Osteomyelitis, fremdkörperassoziierte Infektion, Bakteriämie, Sepsis und nekrotisierende Pneumonie (Becker & Von Eiff, 2011; Deurenberg & Stobberingh, 2008).

Nicht immer führt *S. aureus* unmittelbar zur Infektion. Tatsächlich gehört das Bakterium auch zur physiologischen mikrobiellen Flora (Mikrobiota) von Haut- und Schleimhäuten bei Mensch und Tier. Insgesamt sind etwa 20% der Weltbevölkerung permanent und weitere 30 - 60% intermittierend kolonisiert, ohne Symptome einer Infektion zu zeigen (van Belkum, et al., 2009). Dabei sind die Nasenvorhöfe das häufigste Reservoir von *S. aureus*, es können jedoch - meist über die Hände kontaminiert - auch andere Körperstellen besiedelt sein, wie die Achselhöhlen, der Perineal- und Vaginalbereich oder der Oropharynx (Becker & Sunderkötter, 2012; Wertheim et al., 2005).

Über die Biologie der Kolonisation ist noch wenig bekannt. Sie scheint jedoch mit genetisch bedingten Polymorphismen des Glukokortikoidrezeptors zusammenzuhängen. Diese haben Einfluss auf die Sensibilität des Trägers für Glukokortikoide und offenbar auf die Affinität für *S. aureus* (Van den Akker et al., 2006). Ähnlich konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von oralen Kontrazeptiva mit einer permanenten Kolonisierung assoziiert ist (Zanger et al., 2012). Auch Einflüsse ko-kolonisierender Mikroorganismen werden in diesem Zusammenhang diskutiert (Wos-Oxley et al., 2010). So sind manche Menschen permanent mit *S. aureus* kolonisiert, während andere nie oder nur intermittierend besiedelt sind. Medizinisch bedeutsam wird die Kolonisation, wenn die Barrierefunktion der Haut oder Schleimhäute durchbrochen wird und der Erreger so in den Wirtsorganismus eindringen und tiefer gelegene Gewebe infizieren kann. Beson-

ders bei Dauerträgern von *S. aureus* ist das Risiko einer Autoinfektion mit dem besiedelnden *S. aureus*-Stamm signifikant erhöht (Becker & Sunderkötter, 2012; von Eiff et al., 2001).

1.2 VIRULENZFAKTOREN

1.2.1 PORENBILDENDE TOXINE

S. aureus verfügt über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, unter anderem in Form von Exotoxinen. Das sind Toxine, die von *S. aureus* gebildet werden, aber außerhalb der Bakterienzelle auf den Wirtsmechanismus wirken. Dazu gehören membranschädigende Exotoxine wie das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL) und Gamma-Hämolyisin (HLG). PVL ist ein *S. aureus*-spezifisches, bikomponentes, porenbildendes Leukotoxin, welches in Europa von 1,2% (von Eiff et al., 2004) bis 4,4% (Grundmann et al., 2010) der *S. aureus*-Isolate gebildet wird. Es wirkt auf die Membran von neutrophilen Granulozyten, führt zu deren frühzeitigen Zelltod und schwächt so das Wirtsimmunsystem (Boyle-Vavra & Daum, 2007; Löffler et al., 2010). Krankheiten, die von PVL-positiven *S. aureus*-Stämmen verursacht werden, zeigen häufig schwerwiegendere Verläufe als Infektionen mit PVL-negativen *S. aureus* und können zu massiven Gewebenekrosen, nekrotisierender Pneumonie mit Hämoptyse und Sepsis mit hoher Letalität führen.

Gamma-Hämolyisin ist ähnlich wie PVL ein bikomponentes und porenbildendes Toxin. Es wird von dem *hlg*-Gen kodiert und kann neben neutrophilen Granulozyten und Makrophagen auch Erythrozyten lysieren (Dinges et al., 2000).

1.2.2 PYROGENE SUPERANTIGENE (SAGs)

Eine Besonderheit von *S. aureus* ist die Fähigkeit pyrogene Superantigene (SAGs) zu bilden. Superantigene sind Exotoxine, deren pathogene Wirkung nicht durch das eigentliche Toxin, sondern durch die Induktion einer massiven Immunantwort des Wirtsorganismus mit überschießender Proliferation von T-Lymphozyten erklärt werden kann. Durch die T-Zell-Antwort werden Zytokine freigesetzt, welche wahrscheinlich für die systemischen Symptome wie Blutdruckabfall und Anstieg der Herzfrequenz verantwortlich sind. Zu den klassischen *S. aureus*-spezifischen SAGs gehören das „toxic shock syndrome“ Toxin (TSST-1) und Enterotoxine („staphylococcal enterotoxins“ = SEs; Becker, 2005; Dinges et al., 2000)

TSST-1 wird von dem Gen *tst* kodiert und verursacht das „toxic shock syndrome“. Es wird von bis zu 20,3% der *S. aureus*-Stämme gebildet (Becker et al., 2003; Lehn et al., 1995; Schmitz et al., 1997). Die besten Bedingungen dafür herrschen auf der Vaginalschleimhaut von jungen Frauen während der Menstruation („Menstruationsassoziiertes toxic shock syndrome“). Einmal freigesetzt, kann TSST-1 die Schleimhaut durchdringen und in die Blutbahn gelangen, wo es seine systemische Wirkung entfaltet und zu akut einsetzendem Fieber, Hautrötung und Blutdruckabfall mit multiplem Organversagen und Schock führen kann (Becker et al., 2003; Dinges et al., 2000; McCormick et al., 2001).

Enterotoxine werden bei der Besiedlung von Lebensmitteln durch *S.aureus* gebildet und sind eine der häufigsten Ursachen für Lebensmittelvergiftungen. Die SEs werden in alphabetisch geordnete Gruppen eingeteilt (*sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej*). Sie werden von 70 bis 100% der *S.aureus*-Stämme gebildet (Becker et al., 2003; Lattar et al., 2012; Menegotto et al., 2012; Yu et al., 2012) und führen zu selbstlimitierenden Gastroenteritiden mit Durchfall und Erbrechen. Wie TSST-1 können auch einige Enterotoxine ein menstruationsunabhängiges „toxic shock syndrome“ auslösen (Dinges et al., 2000).

1.2.3 EXFOLIATIVTOXINE

Exfoliativtoxine sind verantwortlich für das „staphylococcal scalded skin syndrome“ (SSSS). Dies ist eine generalisierte, blasenbildende Erkrankung, die vor allem Kinder betrifft und mit plötzlichem Fieber und Erythem auftritt, gefolgt von einer großflächigen epidermalen Hautablösung, jedoch ohne Nekrose oder Entzündung (Yamaguchi et al., 2001, 2002). Exfoliativtoxine werden von circa 1,2% der *S.aureus*-Isolate gebildet (Becker et al., 2003). Zur Zeit sind vier Subtypen beschrieben: Exfoliativtoxin A, B, C und D (ETA - ETD; Lamand et al., 2012). Insbesondere ETD scheint ein bisher unterschätzter Virulenzfaktor zu sein und ist neben dem SSSS auch mit anderen Infektionen wie Haut- und Weichgewebeeinfektionen, Abszessen und Sepsis assoziiert (Czech et al., 2001; Yamasaki et al., 2006; Yamaguchi et al., 2001).

1.2.4 EPIDERMAL ZELLDIFFERENZIERUNGS-INHIBITOREN (EDIN)

Weitere Virulenzfaktoren sind die Toxine der Gruppe der epidermalen Zelldifferenzierungs-Inhibitoren („epidermal cell differentiation inhibitor“, EDIN-A, EDIN-B, EDIN-D). Für den Prototyp dieser Toxinfamilie, EDIN-A, wurde gezeigt, dass er die Differenzierung von Keratinozyten blockieren und so eine Hyperplasie der Epidermis induzieren kann (Sugai et al., 1990). Das Gen für EDIN-B liegt auf der selben Genregion wie das

Exfoliativtoxigenen *etd* und tritt meist in Kombination mit diesem auf (Yamaguchi et al., 2002).

1.3 METHICILLIN-RESISTENTER *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

1.3.1 ANTIBIOTIKA-RESISTENZ

Vor der klinischen Einführung von Penicillin 1941 verliefen Bakteriämien mit *S. aureus* in 80% der Fälle tödlich. Mit Penicillin war ein wirksames Gegenmittel gefunden worden, wogegen jedoch bereits 1942 die ersten Resistenzen beobachtet wurden (Deurenberg & Stobberingh, 2008). Penicillin-resistente *S. aureus* inaktivieren Penicillin mit Hilfe einer beta-Laktamase, einem extrazellulären Enzym, das den beta-Laktam Ring von Penicillin und anderen beta-Laktam-Antibiotika spaltet und sie so funktionsunfähig macht. Heute produzieren über 90% der weltweiten *S. aureus*-Stämme eine beta-Laktamase (Lowy, 2003).

1.3.2 MRSA

Im Jahre 1959 wurde Methicillin, ein beta-Laktamase-stabiles Penicillin, eingeführt. Zwei Jahre später, 1961, entdeckte man die ersten Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA)-Stämme in einem Krankenhaus in Großbritannien. Seit dem haben sich MRSA-Klone weltweit verbreitet (Lowy, 1998, 2003) und führten in den letzten Jahren aufgrund der höheren Morbidität und Mortalität der MRSA-Infektionen zu steigenden Behandlungskosten (Holzknecht et al., 2010).

Für die Methicillin-Resistenz ist das *mecA*-Gen verantwortlich, welches ein zusätzliches, modifiziertes Penicillin-Bindeprotein (PBP2a) mit verminderter Affinität für beta-Laktam-Antibiotika kodiert (Chambers, 1997; Ito et al., 2001). Bei Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) binden beta-Laktam-Antibiotika an die PBPs, die sich in der *S. aureus*-Zellwand befinden. Dies führt zum Abbruch der Peptidoglykanschichtsynthese in der Zellwand und so zum Absterben des Bakteriums. An die von *mecA* kodierte PBP2a jedoch können die meisten beta-Laktam-Antibiotika (Ausnahme: MRSA-wirksame Cephalosporine) nicht binden, die Peptidoglykanschichtsynthese wird nicht gestört und MRSA kann weiter wachsen (Berger-Bächi & Rohrer, 2002).

Das *mecA*-Gen gehört zu einem mobilen genetischen Element, der "staphylococcal cassette chromosome *mec*" (SCC*mec*; Chambers, 1997; Ito et al., 2001). Für die Mobilität dieser Kasette, beispielsweise die Exzision und Integration in ein neues Wirtschromosom, enthält das SCC*mec*-Element spezifische Rekombinasen („cassette

chromosome recombinases“ = *ccr*). Ausgehend von der Kombination ihrer *mec* und *ccr* Genkomplexe (Grundmann et al., 2006), definiert man zur Zeit elf Haupttypen von *SCCmec* (Typen I bis XI; Turlej et al., 2011). Diese Typen unterscheiden sich unter anderem in ihren Resistenzprofilen. Die *SCCmec* Typen I, IV und V enthalten nur *mecA* als Resistenz-vermittelndes Gen und verursachen ausschließlich Resistenzen gegen beta-Laktam-Antibiotika, wohingegen die relativ großen *SCCmec* Typen II und III (34-67 kb) zusätzliche Resistenzgene in Form von Plasmiden und Transposons enthalten können, die Unempfindlichkeiten gegen ein breiteres Antibiotikaspektrum vermitteln. Die Plasmide pUB110 und pT181 auf sind beispielsweise für die Resistenz gegen Aminoglykoside und Tetracycline verantwortlich (Boyle-Vavra & Daum, 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008; Grundmann et al., 2006; Liu et al., 2010).

Die ursprüngliche Herkunft von *SCCmec* ist unklar, es wird jedoch vermutet, dass bis dahin Methicillin-sensible *S. aureus*-Stämme (MSSA) *SCCmec* von koagulase-negativen Staphylokokken-Spezies, wie z.B. *Staphylococcus sciuri*, übernommen haben (Gordon & Lowy, 2008). Aktuell wird jedoch eher von einem Ursprung aus *Micrococcus caseolyticus* ausgegangen (Baba et al., 2009).

In letzter Zeit wurde von zwei Arbeitsgruppen parallel ein neues *SCCmec* Element beschrieben (*SCCmec* XI; García-Álvarez et al., 2011; Shore et al., 2011). Es vermittelt die Antibiotika-Resistenz über ein *mecA*-Homolog (*mecC* oder, früher, *mecA*_{LGA251}), welches für ein weiteres Penicillin-Binde-Protein kodiert. Es wird nicht durch die bisher üblichen Tests für MRSA mittels PCR für das *mecA*-Gen oder den Nachweis von PBP2a mittels eines Agglutinationstests detektiert. Dieses *mecA*-Homolog *mecC* wurde zuerst bei Tieren in England und Dänemark entdeckt, später auch bei Menschen. Es ist zu 70% identisch mit *S. aureus mecA* und meist mit dem klonalen Komplex CC130 entsprechend der „Multilocus Sequenztypisierung“ (MLST; siehe Kapitel 1.4.2) und den *S. aureus* Protein A (*spa*)-Typen (siehe Kapitel 1.4.3) t843, t978, t7189, t1773 und t1535 assoziiert (García-Álvarez et al., 2011; Kriegeskorte et al., 2012; Shore et al., 2011). Der PCR-Nachweis gelingt mithilfe spezifischer Primer, sowie mithilfe von Primern, die sowohl *mecA* als auch *mecA*_{LGA251} (*mecC*) erfassen (C. Cuny & Witte, 2011; Kriegeskorte et al., 2012; Sabat et al., 2012).

1.3.3 HOSPITAL-ACQUIRED MRSA (HA-MRSA)

Seit seiner Entdeckung galt MRSA als klassischer Krankenhauskeim („hospital-acquired“ = HA-MRSA; Fowler et al., 2003). Er ist bis heute der häufigste im Krankenhaus erworbene Infektionserreger (Grundmann et al., 2006) und mit bestimmten Risikofaktoren assoziiert (siehe Tabelle 1 und 5). Die oft multiresistenten MRSA-Stämme

haben durch die häufige Gabe von Antibiotika in Kliniken einen signifikanten Selektionsvorteil gegenüber Methicillin-sensiblen *S. aureus* (Muto et al., 2003). In Deutschland gehören HA-MRSA meist zu den *spa*-Typen t002, t003, t008 und t032 und sind mit den MLST-Typen ST5, ST225, ST8 und ST22 assoziiert (Schaumburg et al., 2012).

1.3.4 COMMUNITY-ASSOCIATED MRSA (CA-MRSA)

Im Jahre 1993 wurden in Westaustralien MRSA aus Haut- und Weichgewebeinfektionen von Angehörigen eines Aborigine-Stammes in Kimberly isoliert. Die betroffenen Personen wiesen keine der üblichen Risikofaktoren für HA-MRSA auf, wie beispielsweise einen vorherigen Krankenhausaufenthalt (Clock et al., 2010; DeLeo et al., 2010). Seither wurden solche ambulant erworbenen oder „community-associated MRSA“ (CA-MRSA) weltweit nachgewiesen (Deurenberg & Stobberingh, 2008; Schaumburg et al., 2012). Die CA-MRSA-Stämme sind typischerweise PVL-positiv und verursachen häufig Infektionen mit ungewöhnlich schweren Verläufen (nekrotisierende Pneumonien, schwere Hautinfektionen, Osteomyelitis, nekrotisierende Faszitiden; Boyle-Vavra & Daum, 2007; Löffler et al., 2010).

Laut dem „Center for Disease Control and Prevention“ (CDC) spricht man von ambulant erworbenem MRSA, wenn das Isolat in einem ambulanten Umfeld oder innerhalb der ersten 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme isoliert wird und die betreffenden Patienten keine der Risikofaktoren für HA-MRSA aufweisen (siehe Tabelle 1 und 5). Der Hauptrisikofaktor für die Kolonisierung und Infektion mit CA-MRSA ist die Einnahme von Antibiotika. Weitere Risikofaktoren sind Auslandsreisen, Mannschaftssport, Operationen und Sexualkontakte, sowie Gefängnisaufenthalte (David et al., 2008; Deurenberg & Stobberingh, 2008; Miller et al., 2009).

Genetisch unterscheiden sich HA- und CA-MRSA in den Elementen für die Methicillin-Resistenz, in ihrer genetischen Herkunft und in einigen Virulenzfaktoren. HA-MRSA tragen üblicherweise die relativ großen *SCCmec* Typen I, II, oder III (34-67 kb). Diese sind, wie oben beschrieben, verantwortlich für eine breitere Antibiotika-Resistenz. Der zumeist mit CA-MRSA assoziierte *SCCmec* Typ ist kleiner (24kb). Er vermittelt, außer der für beta-Laktam-Antibiotika, kaum weitere Resistenzen, ist aber im Austausch zwischen den Stämmen mobiler als die anderen *SCCmec* Typen (Boyle-Vavra & Daum, 2007; Liu et al., 2010). Klassische CA-MRSA-Linien sind die MLST-Typen ST8 mit dem *spa*-Typ t008 (USA300) und ST80 mit dem *spa*-Typ t044 (USA400). Insgesamt scheinen CA-MRSA trotz der höheren Antibiotika-Sensibilität einen Selektionsvorteil vor HA-MRSA zu haben. Sie breiten sich schneller aus, sind infektiöser und kommen mittler-

weile auch zunehmend in Krankenhäusern vor (Boyle-Vavra & Daum, 2007; Schaumburg et al., 2012; Valsesia et al., 2010; <http://www.spaserver.ridom.de>).

1.3.5 LIVESTOCK-ASSOCIATED MRSA (LA-MRSA)

Seit den 2000er Jahren wird MRSA auch bei Tieren, insbesondere in der landwirtschaftlichen Tiermast, nachgewiesen. Bei diesen „livestock-associated MRSA“ (LA-MRSA) handelt es sich meist um MRSA-Isolate mit dem MLST-Typ ST398 und dem spa-klonalen Typ (spa-CC) 011. Dazu gehören die *spa*-Typen t034, t011 und verwandte Typen (t108, t1451, t2576, t4395t, t8377). Wie Huijsdens et al. erstmals 2004 beobachteten, können diese LA-MRSA-Isolate bei engem Kontakt mit LA-MRSA-positiven Tieren auf Menschen übertragen werden und zur Besiedlung und Infektion führen (Huijsdens et al., 2006). So sind 23-86% der Schweinzüchter und Tierärzte mit LA-MRSA besiedelt (Cuny et al., 2009, 2013; Köck et al., 2012, 2013; Wulf et al., 2008).

Da LA-MRSA mittlerweile jedoch auch bei Personen ohne direkten Tierkontakt gefunden wurde, werden mittlerweile auch andere Übertragungswege wie beispielsweise über kontaminiertes Fleisch, Kontakt zu Menschen mit engem Tierkontakt und sogar den Luftweg diskutiert (Bisdorff et al., 2012; Cuny et al., 2013; Schulz et al., 2012).

Insbesondere in Regionen mit vielen Tiermastbetrieben ist die Rate von LA-MRSA in der Bevölkerung hoch, sodass LA-MRSA vermehrt in Krankenhäuser importiert werden kann und mittlerweile verantwortlich für einen signifikanten Anteil auch an stationär erworbenen Infektionen ist (Köck et al., 2009, 2013; Schaumburg et al., 2012; Vanderhaeghen et al., 2010). Einen Vergleich von HA-, CA- und LA-MRSA zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Vergleich von HA-, CA- und LA-MRSA (modifiziert nach Köck et al., 2011)

	HA-MRSA	CA-MRSA	LA-MRSA
Besitz der PVL-Gene	Selten	Häufig	Einzelfälle
Prädominante klinische Manifestation	Postoperative Wundinfektionen, Osteomyelitis, Pneumonie	Eitrige Hautinfektionen, Abszesse, selten Pneumonie, Fasziiitis	unbekannt, wahrscheinlich Spektrum typischer <i>S. aureus</i> -Infektionen
Kennzahlen zur Häufigkeit in Deutschland	Circa 14 000 nosokomiale MRSA-Infektionen/Jahr	2-3% der MRSA in Deutschland sind PVL-positiv; Gesamtinzidenz von CA-MRSA-Infektionen unbekannt	<1% der nosokomialen MRSA-Infektionen deutschlandweit; Zahl der ambulanten Infektionen unbekannt
Risikofaktoren	Krankenhausaufenthalte, Alten- und Pflegeheime, Katheter, chronische Wunden, Antibiotikatherapie	Reisen in Risikogebiete, Kontakt zu Personen mit CA-MRSA Infektion, Kontaktsportarten	Direkter Kontakt zu landwirtschaftlichen Nutztieren, (Landwirte, Veterinäre, Schlachthofmitarbeiter)
Prävention	Screening bei Krankenhausaufnahme, Dekolonisationsmaßnahmen, Hygienemaßnahmen gemäß RKI-Empfehlungen	Waschen von Kleidung, Bettwäsche, Handtüchern möglichst >60°C; ggf. Dekolonisationsmaßnahmen	Sorgfältige Stallhygiene, Dekolonisationsmaßnahmen vor elektiven medizinischen Eingriffen
Häufigste MLST-Typen	ST5, ST22, ST225	ST80, ST8	ST398

1.4 TYPISIERUNGSMETHODEN FÜR MRSA

Um die Entwicklung und Ausbreitung von MRSA zu überwachen, braucht man Typisierungsmethoden, die die Unterscheidung von nicht miteinander verwandten Isolaten ermöglichen und das Erkennen von gemeinsamen Ursprüngen erlauben. Die optimale Methode sollte über eine hohe technische Reproduzierbarkeit und eine hohe Diskrimination verfügen. Auch eine einfache Durchführung und Interpretation, ein geringer Zeitaufwand sowie niedrige Kosten sollten in die Wahl der Methode einbezogen werden.

Man unterscheidet phänotypische von genotypischen Typisierungsmethoden. Bei den phänotypischen Methoden werden bestimmte Eigenschaften der Stämme, wie die Resistenzen gegen Antibiotika und die Expression von Virulenzfaktoren untersucht. Da diese Eigenschaften jedoch häufig durch Phagen oder andere mobile Elemente erworben werden und von unterschiedlichen Umwelteinflüssen abhängen, sind sie schwieriger zu reproduzieren und schlechter vergleichbar als genotypische Methoden, welche mittels DNA-Sequenzierung die molekulare Zugehörigkeit bestimmen (de Sousa & de Lencastre, 2003). Die am häufigsten genutzten Methoden um *S. aureus*-Stämme zu typisieren, sind die Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE), die Multilocus Sequenztypisierung (MLST), die *spa*-Typisierung und *SCCmec*-Typisierung (de Sousa & de Lencastre, 2004; Deurenberg & Stobberingh, 2008).

1.4.1 PULSFELD GELELEKTROPHORESE

Die Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) gilt aufgrund ihres hohen Diskriminationsvermögens als Goldstandard zur Untersuchung von *S. aureus*-Genotypen, beispielsweise bei MRSA-Ausbrüchen. Hierbei wird die chromosomale DNA durch ein Enzym (*smal*) verdaut und die daraus resultierenden DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese voneinander getrennt. Die Bandenmuster der verschiedenen Keime können dann miteinander verglichen werden. Der Nachteil von PFGE ist die schlechte Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse. Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen daran arbeiten, die Ergebnisse mittels Einhaltung strenger Protokolle auch international vergleichbar zu machen, konnten allgemeine Nomenklaturen bis jetzt nur auf nationaler Ebene in einigen Ländern wie den Niederlanden oder den USA entwickelt werden (Deurenberg & Stobberingh, 2008; Murchan et al., 2003).

1.4.2 MULTILOCUS SEQUENZTYPISIERUNG

Die Multilocus Sequenztypisierung (MLST) ist eine Typisierungsmethode, mit der die molekulare Langzeitevolution von *S. aureus* untersucht werden kann. Dafür werden die

Fragmente von sieben *S. aureus*-Genen analysiert („Housekeeping genes“). Jeder Sequenz der einzelnen Genfragmente wird ein bestimmtes Allel zugeordnet. Anhand der Allele wird ein allelisches Profil erstellt, das einem Sequenztyp (ST) zugeordnet wird (Enright et al., 2000). MLST ist eine gute Methode für Langzeitpopulationsgenetische Untersuchungen, da die betreffenden Gene eine geringe Mutationsrate aufweisen. Für Untersuchungen von Ausbrüchen ist die MLST aufgrund des geringen Diskriminationsvermögens weniger geeignet (Deurenberg & Stobberingh, 2008; Mellmann et al., 2006).

1.4.3 SPA-TYPISIERUNG

Die Bestimmung des Sequenzpolymorphismus des *S. aureus* Protein A Gens (*spa*), welches das Staphylokokkenoberflächenprotein A kodiert, ist mittlerweile das meist genutzte MRSA Typisierungssystem (Harmsen et al., 2003; te Witt et al., 2010).

Protein A ist ein Peptidoglykan-gebundenes Oberflächenprotein der *S. aureus*-Zellwand und gehört zu einer Gruppe von Virulenzfaktoren, die in den frühen Phasen einer Infektion produziert werden. Durch Bindung an das Fc-Fragment von Immunglobulin G verhindert es die Opsonisierung und Phagozytose der Bakterien durch das Immunsystem des Wirtes (Kurlenda et al., 2010). Das *spa*-Gen enthält einige funktionell unterschiedliche Regionen. Dazu gehört die Fc-bindende Region oder X Region und der C Terminus, eine Sequenz, die für die Zellwandadhäsion benötigt wird (Frénay et al., 1994, 1996). Die polymorphe Region X besteht aus einer variablen Anzahl von 24bp-repeats. Die Vielfalt der hypervariablen Region X entsteht durch spontane Deletionen und Duplikationen in den repetitiven Einheiten, sowie durch Punktmutationen und scheint keinem natürlichen Selektionsdruck zu unterliegen. Sie ist stabil genug um verwandte Stämme in Gruppen einzuordnen, aber ausreichend variabel um einzelne Klone zu unterscheiden (Shopsin et al., 1999).

Frénay et al. waren die ersten, die die Region X des *spa*-Gens zur Klassifizierung von *S. aureus*-Stämmen nach „*spa*-Typen“ und *spa*-klonalen Komplexen (*spa*-CCs) nutzten. Dafür wird die DNA amplifiziert und durch Restriktionsendonukleasen verdaut (Frénay et al., 1994). Die gut konservierten Regionen neben der X Region Sequenz ermöglichen den Einsatz von typenunabhängigen Universalprimern für die PCR Amplifikation und die anschließende Sequenzierung (Shopsin et al., 1999; Strommenger et al., 2006).

Die *spa*-Typisierung ist für die systematische MRSA-Ausbruchsüberwachung im Klinikalltag besser geeignet als MLST, da sie günstiger und schneller ist (Mellmann et al.,

2006; Shopsin et al., 1999; de Sousa & de Lencastre, 2003). Der wohl größte Vorteil der *spa*-Typisierung sind jedoch die eindeutigen und übertragbaren Sequenzierungsdaten (Mellmann et al., 2006) sowie die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (de Sousa et al., 2006). Dies erleichtert den Austausch zwischen Laboren und ermöglicht die Erstellung von global nutzbaren Datenbanken (Shopsin et al., 1999; te Witt, van Belkum, & van Leeuwen, 2010). Zu diesem Zweck wurde die Ridom StaphType Software entwickelt, mit deren Hilfe *spa*-Typen automatisch analysiert und zusammen mit epidemiologischen Informationen in einer Datenbank gesammelt werden. Über einen zentralen Server (<http://www.spaserver.ridom.de>) werden die *spa*-Typen für alle Nutzer synchronisiert und so die Voraussetzung für eine universelle Nomenklatur geschaffen (Mellmann et al., 2006).

1.4.4 BESTIMMUNG DER AGR-SUBTYPEN

Die Expression der meisten *S. aureus* Virulenzfaktoren wird von vier verschiedenen Subklassen des "accessory gene regulator" (*agr*) kontrolliert. Der *agr*-Locus kodiert einen Zwei-Komponenten Aktivierungsweg, dessen aktivierender Ligand ein autoinduzierendes Peptid (AIP) ist, welches von demselben Locus kodiert wird. Aufgrund eines Polymorphismus in der Aminosäuresequenz für das AIP und seinen Rezeptor kann *S. aureus* in vier *agr*-Subtypen (*agrI* - *IV*) unterteilt werden. Innerhalb einer Gruppe aktivieren sich die *agr*-Loci gegenseitig, wohingegen AIPs unterschiedlicher Gruppen inhibitorisch aufeinander wirken. Dadurch können funktionelle Varianten innerhalb des *agr*-Locus dazu dienen, Staphylokokkenpopulationen zu isolieren und entsprechend ihres Genotyps zu gliedern (Jarraud et al., 2002; von Eiff et al., 2004).

1.5 ARBEITSAUFGABE

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Sequenz-basierte Genotypisierung (*spa*-Typisierung) von MRSA-Isolaten aus ganz Deutschland um Erkenntnisse zur aktuellen Epidemiologie, den genetischen Hintergründen und der Ausstattung mit Virulenzfaktoren von MRSA-Stämmen aus dem Jahr 2010 zu erlangen. Hierfür sollte von 1603 MRSA-Isolaten aus mikrobiologischen Zentren aus ganz Deutschland der *spa*-Typ mittels PCR ermittelt werden. Zudem sollte für jedes Isolat ein Fragebogen zu klinischen Daten ausgefüllt und ausgewertet werden. Aus den so gewonnenen epidemiologischen und molekularbiologischen Daten sollte eine Datenbank erstellt und ausgewertet werden.

Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die deutschlandweit und regional vorherrschenden MRSA-Genotypen gelegt werden. Weitere wichtige Punkte waren der Anteil ambulant erworbener MRSA-Infektionen, das Vorkommen von livestock-assoziierten MRSA-Isolaten sowie die Verteilung von Virulenzfaktoren und mögliche Assoziationen zwischen Genotyp und Virulenzfaktoren.

2 MATERIAL UND METHODE

2.1 STUDIENAUFBAU

Die hier vorgestellte Arbeit umfasst die zweite Sammlungsperiode einer multizentrischen, deutschlandweiten Studie, deren erste Sammlungsperiode im Zeitraum vom 01.02.2004 bis zum 31.01.2005 stattfand (Schaumburg et al., 2012). Es wurden erneut die 36 labordiagnostische Zentren mit medizinisch-mikrobiologischer Diagnostik aus der ersten Sammlungsperiode angeschrieben und darum gebeten, im Zeitraum vom 01.02.2010 bis zum 31.01.2011 MRSA-Isolate aus der Routinediagnostik konsekutiv zu sammeln und zu kryokonservieren. Die teilnehmenden Labore bearbeiten Proben aus dem ambulanten und stationären Bereich (Primär- bis Maximalversorgung). Pro Patient wurde nur ein Isolat eingeschlossen und für jedes Isolat angegeben, ob die Probe von einem Patienten mit oder ohne klinische Zeichen einer MRSA-Infektion gewonnen wurde. Nach Erreichen einer Gesamtzahl von 50 Isolaten oder nach Ablauf der 12 Monate wurden die Isolate mit den ausgefüllten Fragebögen per Kurierdienst an das Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster geschickt, wo sie archiviert, analysiert und charakterisiert wurden.

2.2 EPIDEMIOLOGISCHE UND KLINISCHE DATENERHEBUNG

Für jedes Isolat wurde ein Dokumentationsbogen ausgehändigt (siehe Abbildung 1 und 2) und die teilnehmenden mikrobiologischen Zentren wurden gebeten, diesen auszufüllen. Die erste Seite war obligat, die Seiten zwei und drei konnten fakultativ ausgefüllt werden. Die mithilfe des Fragebogens erhobenen Daten wurden anschließend in eine Datenbank (microsoft access 2010) eingegeben und ausgewertet.

An epidemiologischen Daten wurden von jedem Patient Geschlecht, Alter und Herkunftsregion (Einzugsgebiet des jeweiligen Zentrums) erhoben. Klinisch wurde zunächst unterschieden, ob der MRSA-Nachweis ambulant oder stationär erfolgte. Bei stationären Patienten wurde die Station genauer differenziert (Normalstation, Intensivstation, Hämato-Onkologie, Dialysestation). Als zweiter bedeutender Punkt wurden unterschieden, ob bei dem zugehörigen Isolat ein Zusammenhang mit einer klinisch relevanten Infektion bestand. Die Zentren wurden außerdem darum gebeten, das Material anzugeben, aus dem der MRSA isoliert worden war.

Auf den fakultativen Seiten zwei und drei (Abbildung 2) konnten weitere Angaben zu dem jeweiligen Patienten gemacht werden. Als erstes konnte die genaue Umgebung

(Setting), in dem die Infektion oder Kolonisation vermutlich stattgefunden hatte, besser eingegrenzt werden. Dafür wurden Risikofaktoren für eine Infektion oder Besiedlung mit MRSA abgefragt, wie zum Beispiel der vorherige Aufenthalt in einem Krankenhaus, einer Reha- oder Pflegeeinrichtung (siehe Kapitel 3.1.6, Tabelle 5). Außerdem konnten perkutane Fremdkörper, Endoimplantate und chronische Grunderkrankungen angegeben werden (Seite 2). Auf der dritten Seite wurde die Assoziation des MRSA-Nachweises mit einer klinisch relevanten Infektion genauer beschrieben (beispielsweise Abszess, Pneumonie oder nicht fremdkörperassoziierte Sepsis). Um das Risiko für eine Kolonisierung mit LA-MRSA besser beurteilen zu können, sollte als letzter Punkt etwaiger Kontakt zu Haus- und Nutztieren genannt werden.

Patient:

Initialien vom 1. Vornamen und vom 1. Nachnamen; Geb.-datum (DD/MM/YY); Geschlecht (M/W)

Tier, bitte nicht ausfüllen!

Name Ihres Labors/Instituts:

Ihre Labor-Nr. des MRSA-Isolates:

Aufnahme-Datum:

(des Patienten in die Einrichtung; DD/MM/YY)

Datum der Materialgewinnung:

(auf Station/in der Ambulanz; DD/MM/YY)

stationär: Patient von: Normalstation
 ambulant: Intensivstation
 Hämato-Onkologie
 Dialyse

Besteht eine Assoziation des MRSA-Nachweises mit klinisch-relevanter Infektion? ja nein unbekannt*

(nähere Erläuterung auf der Rückseite möglich) (* auch nach Rücksprache mit dem behandelnden Arzt nicht erzielbar)

Material: Nasenabstrich
(aus dem der MRSA isoliert worden ist; bitte Zutreffendes ankreuzen bzw. ergänzend ausfüllen) Haut-/Schleimhautabstrich, wo:

Fremdkörper:
 Blut Katheter, zentral (venös, arteriell)
 Liquor Katheter, peripher
 Sputum Dialyse-Kathetersysteme
 Trachealsekret Port-Systeme u.ä.
 Bronchialsekret Endoprothesen, welche:
 BAL Harnwegs-Katheter
 Urin **Invasiv** gewonnenes Material:
 Sonstiges, was Aspirat/Sekret, welches:
 Gewebe, welches:

Abbildung 1: Fragebogen zur Erhebung klinischer und epidemiologischer Daten, Seite 1

(* auch nach Rücksprache mit dem behandelnden Arzt nicht ersichtbar)			ja	nein	un- bekannt*
Vorherige MRSA-Infektion/Kolonisation bekannt:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Mehr als 48 Std. hospitalisiert vor Nachweis des ersten MRSA-Isolats:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Hämo- oder Peritonealdialyse innerhalb der letzten 12 Monate:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Chirurgischer Eingriff innerhalb der letzten 12 Monate:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Krankenhausaufenthalt innerhalb der letzten 12 Monate:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Aufenthalt in einer Pflege-, Alten-, Reha.-Einrichtung innerhalb der letzten 12 Monate:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

Bitte spezifizieren:	
Endo-Implantatträger: (z. B. Gelenk-Endoprothesen, künstl. Herzklappen)
Langzeit-Träger perkutaner Fremdkörper: (z.B. Kathetersysteme, Trachealkanülen)
Antibiotika-Gabe unmittelbar vor Nachweis des MRSA (welche, wie lange):

Grunderkrankung (auch mehrere Angaben möglich):	
<input type="checkbox"/> Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/> chron. Lebererkrankung
<input type="checkbox"/> chronische Hauterkrankung	<input type="checkbox"/> chron. Niereninsuffizienz
<input type="checkbox"/> Alkohol- und Drogenabusus	<input type="checkbox"/> chron. Atemwegserkrankung
<input type="checkbox"/> HIV/AIDS	<input type="checkbox"/> solide Tumorerkrankung
<input type="checkbox"/> systemische, immunsuppressive Therapie	<input type="checkbox"/> sonstige, welche
<input type="checkbox"/> hämato-onkologische Erkrankung

Assoziation des MRSA-Nachweises mit klinisch-relevanter Infektion:	
<input type="checkbox"/> Sepsis (nicht Fremdkörper-assoz.)	<input type="checkbox"/> Pneumonie
<input type="checkbox"/> Fremdkörper-assoz. Infektion	<input type="checkbox"/> Abszess
<input type="checkbox"/> Post-OP Wundinfektion	<input type="checkbox"/> Meningitis
<input type="checkbox"/> Haut- und Weichgewebeeinfektion	<input type="checkbox"/> Harnwegsinfektion
<input type="checkbox"/> Osteomyelitis	<input type="checkbox"/> sonstige, welche

Kontakt zu landwirtschaftlicher Tierhaltung (auch mehrere Angaben möglich):	
<input type="checkbox"/> Schwein	<input type="checkbox"/> Rind
<input type="checkbox"/> Geflügel	<input type="checkbox"/> sonstige, welche
<input type="checkbox"/> Kein Tierkontakt
<input type="checkbox"/> Nicht bekannt	

Kontakt zu Haus- und Sporttieren (auch mehrere Angaben möglich):	
<input type="checkbox"/> Hund	<input type="checkbox"/> Katze
<input type="checkbox"/> Pferd	<input type="checkbox"/> sonstige, welche
<input type="checkbox"/> Nager
<input type="checkbox"/> Kein Tierkontakt	
<input type="checkbox"/> Nicht bekannt	

Abbildung 2: Fragebogen zur Erhebung klinischer und epidemiologischer Daten, Seite 2 und 3

2.3 MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG

Die Speziesbestätigung von *S. aureus* erfolgte mittels PCR-Nachweis des *nuc*-Gens, dem Gen für eine *S. aureus* typische thermostabile Nuklease. Die Methicillin-Resistenz wurde mittels PCR-Nachweis des *mecA*-Gens (Becker et al., 2006) gesichert. Für Isolate, die phänotypisch Methicillin-resistent waren aber nicht das *mecA*-Gen kodierten, wurde eine PCR für *mecC* (*mecA_{LGA251}*) angewandt (Kriegeskorte et al., 2012).

Der Nachweis der Gene für Enterotoxine (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*), Exfoliativtoxine (*eta*, *etb*, *etd*), das „toxic shock syndrome“-Toxin (*tst*), und den „epidermal cell differentiation inhibitor“ (*edin-A*, *edin-B*, *edin-C*) erfolgte mittels Multiplex-PCR (Becker et al., 1998, 2003; Yamaguchi et al., 2001, 2002).

Subtypen des „accessory gene regulator“ (*agrI - IV*) wurden mittels PCR bestimmt (von Eiff et al., 2004). Der PCR-basierte Nachweis von *nuc* und *mecA* beziehungsweise *mecC*, den Genen der Virulenzfaktoren und *agr*-Subtypen wurde in Zusammenarbeit mit dem PCR-Labor am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster durchgeführt.

2.4 NACHWEIS DES PROTEIN A-GENS MITTELS SPA-TYPISIERUNG

2.4.1 DNA-ISOLATION

Die DNA-Isolation wurde mittels Chelex-DNA-Extraktion der Firma BioRad (München) durchgeführt. Die verwendete InstaGene™ Matrix enthält mikroskopisch kleine Partikel, die 2-wertige Kationen binden. Dadurch verlieren DNA-schneidende Enzyme (DNAsen) ihre für die Funktion essentiellen Coenzyme. Bei 56°C werden Zellverbände gelöst und Enzyme inaktiviert, bei 100°C werden die restlichen Zellstrukturen zerstört, so dass die DNA freigesetzt wird und für molekularbiologische Verfahren verwendet werden kann. Die Partikel befinden sich in einer Pufferlösung, welche eine Lagerung der DNA bei -20°C erlaubt. Zunächst wurden von jedem Isolat Proben auf Blutagar ausgestrichen und für 24 Stunden bebrütet. Jeweils 1 - 2 der Kolonien wurden dann in 100 Mikroliter der InstaGene™ Matrix (Chelex) suspendiert. Nach dem Erhitzen für 10 Minuten bei 100°C wurde die Mischung 3 Minuten bei 12 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand (etwa 50 µl) wurde in PCR-Tubes (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) übertragen und die so gewonnene DNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.4.2 PCR-PROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION DES SPA-GENS

Für die *spa*-Amplifizierung wurden die Primer *spa_239f* und *spa_1717r* verwendet (siehe Tabelle 2).

Es wurde pro Probe ein 25 µl Ansatz aus 1 µl extrahierter DNA, je 2 µl der oben genannten Primer, 12,5 µl RedTaq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 7,5 µl Wasser hergestellt und anschließend die PCR-Zyklen, wie in Tabelle 3 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 2: Primer für die spa-Typisierung. Alle Primer sind in 5' 3' Orientierung angegeben (f=forward; r=reverse; Mellmann et al., 2008)

	Primer	Sequenz
Amplifikation	spa_239f	5'-ACTAGGTGTAGGTATTGCATCTGT-3'
	spa_1717r	5'-TCCAGCTAATAACGCTGCACCTAA-3'
Sequenzierung	M13_spa_f	5'-TGTA AACGACGGCCAGTTAAA GACGATCCTTCGGTGAGC-3'
	M13_spa_r	5'-CAGGAAACAGCTATGACCC AGCATAGTGCCGTTTGCTT-3'
alternative Primer	spa_1084f	5'-ACAACGTAACGGCTTCATCC-3'
	spa_1618r	5'-TTAGCATCTGCATGGTTTGC-3'

Tabelle 3: PCR-Protokoll zur Amplifikation des spa-Gens

Anzahl der Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1x	Initiale Denaturierung	95 °C	1 min
35x	Denaturierung	95 °C	1 min
	Hybridisierung	60 °C	1 min
	Elongation	72 °C	1 min
1x	terminale Elongation	72 °C	5 min
1x	Kühlung	12 °C	<i>hold</i>

2.4.3 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Zur Überprüfung der Amplifikationsprodukte wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein 2-prozentiges Agarosegel aus 200 ml TAE-Puffer und 4 g Agarose hergestellt. In jede Gelkammer wurden 8 µl des Amplifikats gegeben und für 20 Minuten bei einer Spannung von 140 Volt im Agarosegel aufgetrennt. Nach der anschließenden Färbung im Ethidiumbromid-Färbebad konnten die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

2.4.4 AUFREINIGUNG DES PCR-PRODUKTES MIT EXOSAP

Für die enzymatische Aufreinigung des Amplifikats (Entfernung überschüssiger DNA-Einzelstränge) wurde Exonuklease I (SS, New England Biolabs, Frankfurt) und Shrimp alkalische Phosphatase (SAP, USB Amersham, Cleveland Ohio, USA) verwendet. Je 5 µl PCR-Amplifikat wurde mit 1 µl SAP (1 U/µl), 0,05 µl Exonuklease (1 U/µl), units angegeben und 0,95 µl 1x TE-Puffer für 45 Minuten bei 37°C inkubiert und schließlich für 10 Minuten bei 80°C inaktiviert. Danach wurde die Lösung auf 12°C heruntergekühlt.

2.4.5 DNA-SEQUENZIERUNG

Als Primer für die Sequenzierungsreaktion haben wir M13_spa_r und M13_spa_f (siehe Tabelle 2) verwendet. Es wurden 2 µl des aufgereinigten PCR-Amplifikats in einem 10 µl Ansatzes unter Verwendung von 0,5 µl BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA), 1,8 µl BigDye Terminator 5xSequencing Buffer, 7 µl Wasser und 2 µl des jeweiligen Primers (forward oder reverse) angesetzt und im Cyclor sequenziert (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: PCR-Protokoll für die Sequenzierungsreaktion

Anzahl der Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
25x	Denaturierung	96°C	10 s
	Elongation	60°C	2 min
1x	Kühlung	12°C	<i>hold</i>

Die Sequenzierungsprodukte wurden im 96-Well-Format mittels Fällungsreaktion aufgereinigt. Hierfür wurden zu 10 µl der Sequenzierungsreaktion 40 µl einer Ethanol/Na-Acetat-Lösung gegeben (1,5 µl 3M Na-Acetat, pH 4,6 (Merck, Darmstadt), 31,25 µl 96% Ethanol, 7,25 µl Wasser).

Nach 30-minütiger Präzipitation bei Raumtemperatur wurden die Proben 30 Minuten bei 2754 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die überstehende Flüssigkeit bei 50 x g abzentrifugiert, 150 µl 70%iger Ethanol hinzugefügt und die Proben noch einmal 10 Minuten bei 2754 x g in selber Orientierung der Mikrotiterplatten zentrifugiert. Erneut wurden die Platten bei 50 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die aufgereinigte DNA 5 Minuten bei 45°C in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Nachfolgend wurden die Produkte mit 25 µl HI-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) für die Sequenzierung resuspendiert.

Die DNA-Sequenzen wurden mit dem ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) ermittelt und mit der Ridom StaphType Software version 1.5 beta (Ridom GmbH, Würzburg) ausgewertet (Harmsen et al., 2003).

Verwandte *spa*-Typen wurden in *spa*-CCs zusammengefasst. Hierfür wurde der „based upon repeat pattern“ (BURP) Algorithmus verwendet mit den Exklusionskriterien „Anzahl der repeats“ (<5)“ und „Anzahl der costs“ (<4; Ridom Staph Type 2.1.1.; Mellmann et al., 2008).

Konnten Isolate nicht mittels der Standardprimer *spa*-typisiert werden, setzten wir alternative Primer ein (siehe Tabelle 2). MRSA-Isolate, bei denen die *spa*-Typisierung auch nach zwei Versuchen mit den alternativen Primern zu keinem Ergebnis führte, wurden als nicht typisierbar eingestuft.

2.5 MULTILOCUS SEQUENZTYPISIERUNG

Den zehn häufigsten *spa*-Typen wurden die bisher zu diesen *spa*-Typen veröffentlichten Multilocus Sequenztypen (MLST) zugeordnet (<http://www.spaserver.ridom.de>). Für die *spa*-Typen, von denen bisher kein MLST Sequenztyp bekannt war, wurde bei einem Isolat exemplarisch die MLST durchgeführt (Enright et al., 2000).

2.6 STATISTIK

Die Daten wurden mit IBM SPSS statistic 20 analysiert. Kontinuierliche Variablen wurden mittels student's t-Tests miteinander verglichen. Assoziationen zwischen kategori-

schen Variablen wurden mithilfe des Chi-Quadrat-Tests oder „Fisher’s exact tests“ ermittelt und die „odds ratio“ (OR) und das 95% Konfidenzintervall (KI) berechnet. Nicht-parametrische Tests von unabhängigen Stichproben wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests und des Kolmogorov-Smirnov-Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau war 0,05. Fehlende Werte wurden aus der Statistik eliminiert. Bei normalverteilten kontinuierlichen Variablen wurden Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung (\pm SD) gebildet.

3 ERGEBNISSE

3.1 DEMOGRAPHISCHE DATEN

3.1.1 STUDIENAUFBAU

Von den 36 angeschriebenen Zentren aus der ersten Sammlungsperiode 2004/2005 (Schaumburg et al., 2012) nahmen 33 erneut an der Studie teil. Jedes wurde gebeten 50 Isolate einzuschicken. Rechnerisch wurden dementsprechend 1650 Isolate erwartet. Tatsächlich wurden 1603 Isolate eingeschickt und in die Studie aufgenommen, da einige Zentren nicht in der vorgegebenen Zeit 50 Isolate sammeln konnten oder sich die eingesandten Isolate nicht als MRSA verifizieren ließen.

Die 1603 Patienten, deren MRSA-Isolate in die Studie aufgenommen und charakterisiert wurden, waren zwischen 0 und 99 Jahre alt (zwei Patienten blieben ohne Angabe). Der Altersmittelwert (\pm Standardabweichung) der teilnehmenden Patienten lag bei 65,3 (\pm 20,4) Jahren (Median: 70,57), dabei waren 1257 (78,4%) Patienten über 50 Jahre alt. Die Patienten waren zu 56% männlich (n=898) und zu 41,9% weiblich (n=671), 2,1% (n=34) blieben ohne Geschlechtsangabe.

3.1.2 STATIONÄRE UND AMBULANTE VERSORGUNG DER PATIENTEN

Es wurden Patienten aus verschiedenen Behandlungsbereichen in die Studie aufgenommen. So wurde MRSA bei 77,1% (n=1236) der Patienten während eines stationären Aufenthaltes nachgewiesen, 21,3% (n=342) waren ambulant versorgt worden, bei 1,6% (n=25) der Patienten wurde nicht zwischen ambulant und stationär unterschieden. Von den 1236 stationären Patienten befanden sich zur Zeit des Nachweises 72,9% (n=901) auf einer Normalstation, 20,1% (n=249) auf einer Intensivstation, 1,4% (n=17) auf einer hämato-onkologischen und 0,2% (n=3) auf einer Dialysestation. Bei 5,3% (n=66) der stationär betreuten Patienten wurde die Station nicht näher beschrieben. Von den ambulanten Patienten wurde bei sieben (2%) der Nachweis ambulant auf einer Dialysestation, bei zwei (0,6%) auf einer hämato-onkologischen Station erbacht.

3.1.3 MATERIALVERTEILUNG

Die eingeschickten MRSA-Isolate wurden unabhängig von dem Material, aus dem sie gewonnen worden waren, in die Studie eingeschlossen. In Abbildung 3 sind alle Materialien aufgeführt, von denen MRSA-Proben für die Studie isoliert wurden. Zur besseren Übersicht sind einige Materialien in folgende Übergruppen zusammengefasst: Haut-/Schleimhaut-/Nasenabstrich, Wundabstrich (Wund- und Ulkusabstriche), Respira-

tionstrakt (Tracheal- und Bronchialsekret, Sputum, Bronchoalveoläre Lavage), fremdkörperassoziierte Materialien (zentrale und periphere Katheter, Dialysekathetersysteme, Harnwegskatheter, Portsysteme und Endoprothesen), Urin, Stuhl, Aspirat/Sekret, Gewebe, Blut, und Liquor. Unter „sonstige Materialien“ sind Materialien vermerkt, die nicht im Fragebogen aufgeführt worden waren. Am häufigsten wurden Isolate aus Haut-, Schleimhaut- und Nasenabstrichen eingeschickt (54,2%; n=871), gefolgt von Wundabstrichen (17,2%; n=277) und Isolate aus dem Respirationstrakt (9,5%; n=153; siehe Abbildung 3). Bei 30 Proben (1,8%) blieb das Material unbekannt.

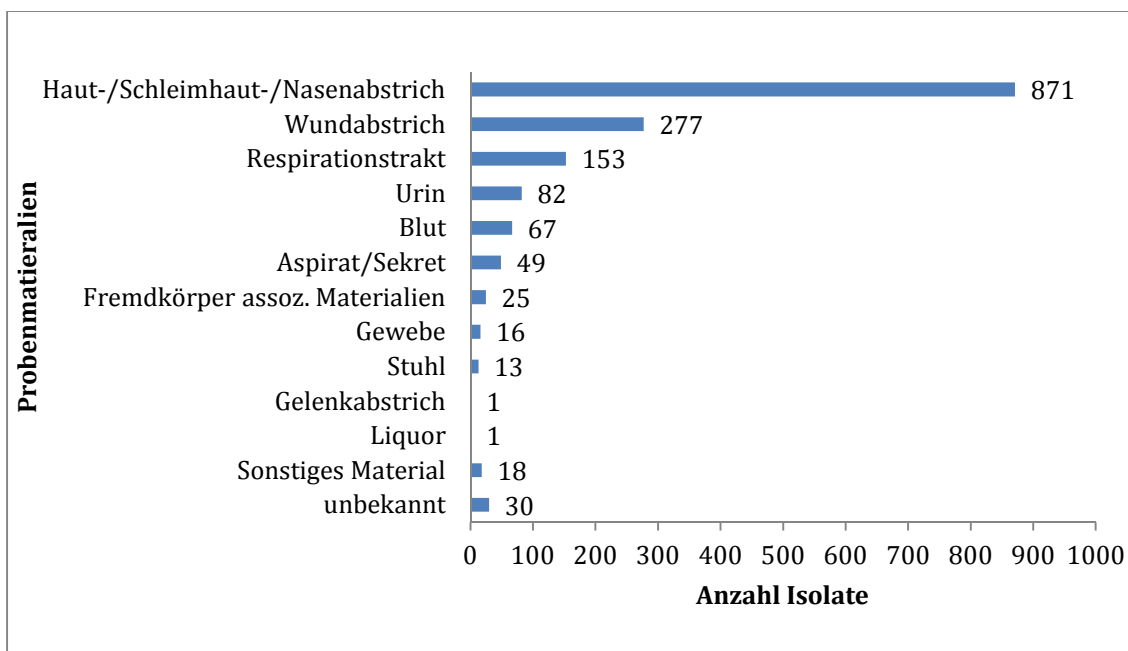


Abbildung 3: Materialverteilung der eingeschickten Isolate, n=1603. Von den 1574 Isolaten, bei denen bekannt war, aus welchem Probenmaterial sie stammen, wurde die Mehrzahl aus Haut- und Schleimhautabstrichen isoliert. Ohne Materialangabe blieben 30 Isolate.

3.1.4 ASSOZIATION DER MRSA-ISOLATE MIT INFESTIONEN

Bei 1030 Patienten (64,3%) wurden Angaben zur Assoziation mit Infektionen gemacht. Davon stammen 46,9% (n=483) der Isolate von asymptomatischen Trägern, 53,1% (n=547) waren infektionsassoziiert. Bei 441 Patienten konnte die Infektion näher be-

stimmt werden (siehe Abbildung 4). Die häufigsten Infektionen waren Haut- und Weichgewebeeinfektionen, zu denen auch Wundinfektionen gezählt wurden (n=201).

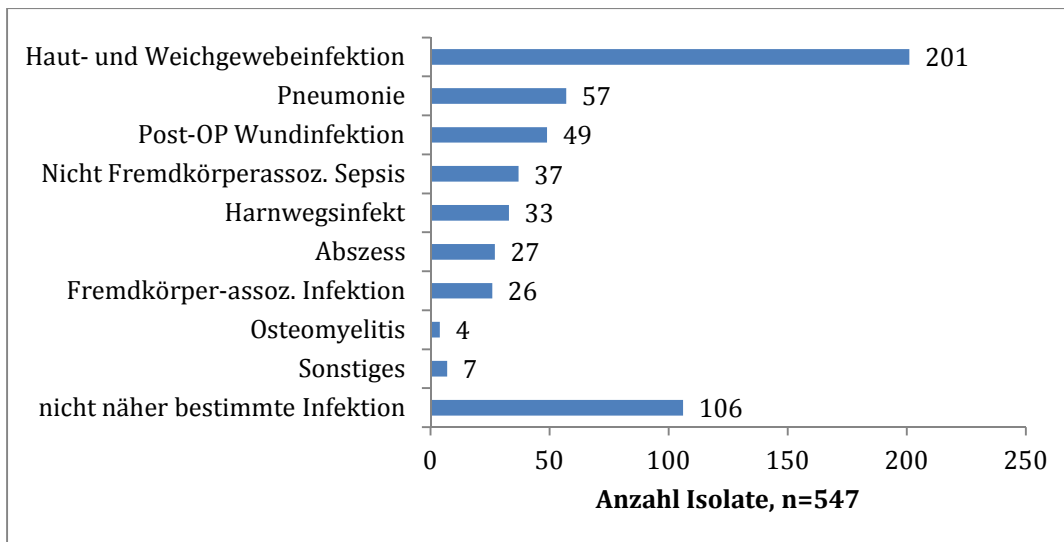


Abbildung 4: Verteilung der Infektionen mit MRSA-Nachweis. Von den 547 Isolaten mit Angabe zu einer Assoziation mit einer Infektion stammten mit 37,1% (n=201) die meisten Proben von Haut- und Weichgewebeeinfektionen. Bei 1056 Patienten war es unbekannt, ob der MRSA-Nachweis mit einer Infektion zusammenhing.

3.1.5 GRUNDERKRANKUNGEN DER PATIENTEN

Für 35,2% (n=565) der Patienten ermittelten wir vorhandene chronische Grunderkrankungen (siehe Abbildung 5) wobei Mehrfachnennungen möglich waren. Die häufigste Erkrankung war Diabetes mellitus und kam bei 31,7% (n=179) der Patienten mit Angaben zu Erkrankungen vor. An zweiter Stelle standen kardiovaskuläre Erkrankungen mit 27,1% (n=153).

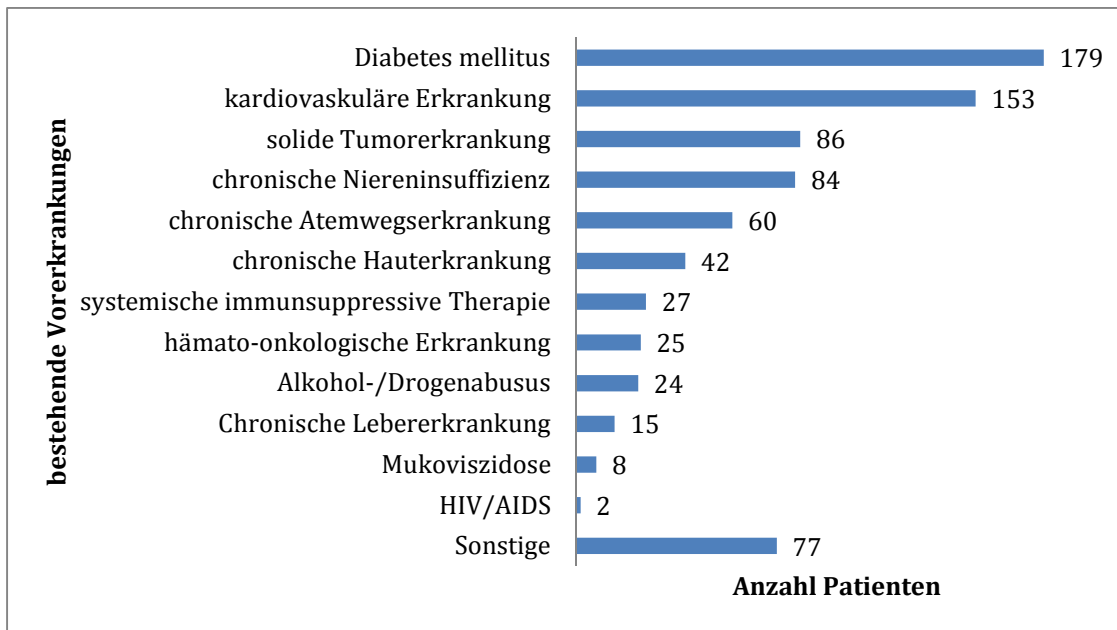


Abbildung 5: Chronische Grunderkrankungen der Patienten (n=565) Die häufigsten Grunderkrankungen in unserem Patientenkollektiv waren Diabetes mellitus (31,7%) und kardiovaskuläre Erkrankungen (27,1%). Zu 1038 Patienten wurde keine Angabe gemacht.

3.1.6 ANAMNESTISCHE RISIKOFAKTOREN FÜR DEN NOSOKOMIALEN MRSA-ERWERB

Um das Risiko für eine nosokomiale Infektion oder Besiedlung mit MRSA epidemiologisch zu erfassen, wurden folgende Risikofaktoren analysiert: (i). vorherige MRSA-Infektion/Kolonisation bekannt; (ii). mehr als 48 Stunden hospitalisiert vor Nachweis des 1. MRSA-Isolats; (iii). chirurgischer Eingriff innerhalb der letzten 12 Monate; (iv). Krankenhausaufenthalt innerhalb der letzten 12 Monate; (v). Häm- oder Peritonealdialyse innerhalb der letzten 12 Monate und (vi). Aufenthalt in einer Pflege-, Alten- oder Rehabilitationseinrichtung innerhalb der letzten 12 Monate. Wiesen die Patienten einen oder mehr dieser Risikofaktoren für auf, gingen wir von einem nosokomialen Erwerb aus. In unserer Studie war dies bei 43,6% (n=699) der Patienten der Fall, diese hatten zwischen einem und fünf Risikofaktoren. Bei 9,3% (n=150) waren keine Risikofaktoren bekannt, 47% (n=754) blieben ohne Angabe (siehe Tabelle 5). Im Mittel wiesen die Patienten mit Angaben zu Risikofaktoren 1,8 (\pm 1,3) Risikofaktoren auf (Spannweite: 0-5; Median: 2; siehe Abbildung 6).

Tabelle 5: anamnestische Risikofaktoren für eine MRSA-Besiedlung. n=1603

Risikofaktor	ja Anzahl (%)	nein Anzahl (%)	unbekannt Anzahl (%)
Vorherige MRSA-Infektion/Kolonisation bekannt	219 (30,2)	505 (31,5)	879 (54,8)
Mehr als 48 Std. hospitalisiert vor Nachweis des ersten MRSA-Isolats	312 (19,5)	440 (27,4)	851 (53,8)
Chirurgischer Eingriff innerhalb der letzten 12 Monate	307 (54,9)	252 (15,7)	1044 (65,1)
Krankenhausaufenthalt innerhalb der letzten 12 Monate	512 (82,8)	106 (6,6)	985 (61,4)
Hämo- oder Peritonealdialyse innerhalb der letzten 12 Monate	59 (11,5)	455 (28,4)	1089 (67,9)
Aufenthalt in einer Pflege-, Alten- oder Reha- Einrichtung innerhalb der letzten 12 Monate	137 (30)	320 (19,9)	1146 (71,5)

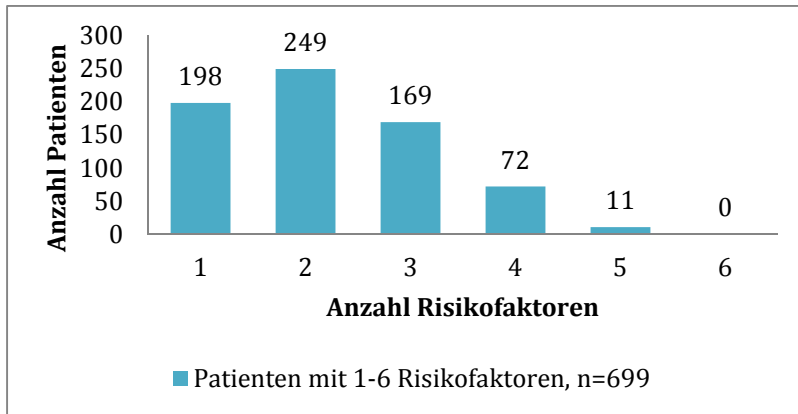


Abbildung 6: Anzahl der Risikofaktoren für eine MRSA-Besiedlung. Im Mittel wiesen die 699 Patienten mit Angaben zu Risikofaktoren $1,8 (\pm 1,3)$ Faktoren auf. bei 904 Patienten wurden keine Angaben zu Risikofaktoren gemacht.

3.1.7 ANTIBIOTIKATHERAPIEN ZUR ZEIT DES MRSA-NACHWEISES

Ein wichtiger Selektionsfaktor für die Besiedlung mit MRSA ist die vorherige Einnahme von Antibiotika, die nicht wirksam gegen MRSA sind. Bei 351 Patienten (21,9%) konnten Daten zu vorherigen Antibiotikatherapien gesammelt werden. Davon hatten 41% (n=144) eine Antibiotikatherapie erhalten, 20% (n=70) mit mehr als einem Präparat. Bei 135 Patienten konnte das Präparat eruiert werden. Demnach wurde am häufigsten Penicillin in Kombination mit einem Penicillinasehemmer verabreicht (25,9%; n=35), außerdem Fluorchinolone (24,4%; n=33) und Cephalosporine (21,5%; n=29; siehe Abbildung 7).

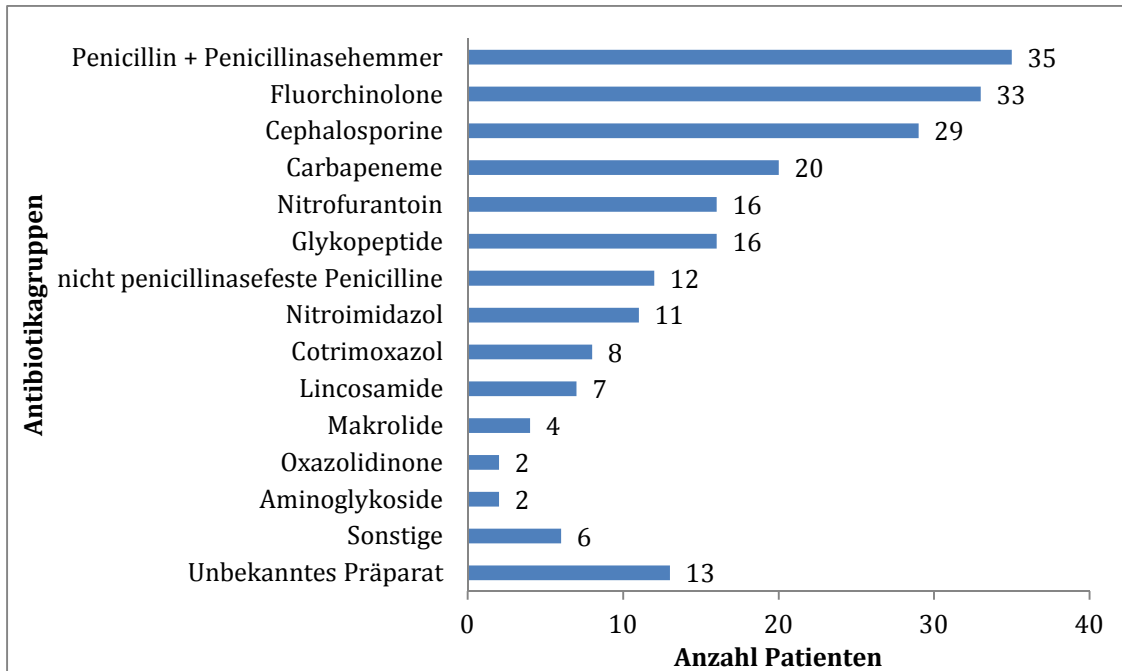


Abbildung 7: Antibiotikapräparate vor MRSA-Nachweis (Mehrfachnennungen möglich). Für 144 Patienten (9%) wurden Antibiotikapräparate angegeben, die vor dem MRSA-Nachweis eingenommen worden waren. Penicilline wurden am häufigsten verabreicht, gefolgt von Fluorchinolonen und Cephalosporinen. 70 (4,4%) Patienten hatten mehr als ein Präparat erhalten, 1252 blieben ohne Angabe.

3.2 MOLEKULARE ERGEBNISSE

Alle Isolate waren *nuc*-positiv und enthielten bis auf ein Isolat das klassische *mecA*-Gen. Ein Isolat enthielt das *mecA*_{LGA251} Homolog (*mecC*, *spa*-Typ t843). Dieses wurde von einer 88-jährigen Patientin mit chronisch respiratorischer Erkrankung aus einem Haut- /Schleimhautabstrich isoliert.

3.2.1 ERGEBNISSE DER SPA-TYPISIERUNG

Alle 1603 Isolate wurden *spa*-typisiert. Es konnten 236 *spa*-Typen unterschieden werden, von denen 157 nur einmal vorkamen (für die zehn häufigsten *spa*-Typen siehe Tabelle 6). Die *spa*-Typen konnten 13 verschiedenen *spa*-klonalen Komplexen (*spa*-CCs) nach BURP-Analyse zugeordnet werden (für die zehn häufigsten *spa*-CCs siehe Tabelle 7 und Abbildung 8 bis 13). Neun der Isolate (0,6%) waren nicht *spa*-typisierbar. Der deutschlandweit häufigste *spa*-Typ war t003 (40,0%; n=639), gefolgt von t032 (15,5%; n=249) und t008 (n=72). Mehr als die Hälfte (55,4%; n=888) der Isolate gehörten zu den zwei häufigsten *spa*-Typen t003 und t032.

Tabelle 6: die zehn häufigsten *spa*-Typen dieser Studie

Rang	MRSA-Isolate			
	<i>spa</i> -Typ	MLST ^a	Häufigkeit, Anzahl (%)	kumulative Häufigkeit, %
1	t003	ST5, ST225	639 (39,9)	39,9
2	t032	ST22	249 (15,5)	55,4
3	t008	ST8, ST247, ST250, ST254	72 (4,5)	59,9
4	t002	ST5, ST231	51 (3,2)	63,1
5	t034	ST398 ^b	41 (2,6)	65,6
6	t011	ST398 ^b	38 (2,4)	68
7	t045	ST5, ST225	28 (1,8)	69,7
8	t014	ST672, ST225 ^c	21 (1,3)	71,1
9	t8374	ST22 ^d	19 (1,2)	72,2
10	t022	ST22	19 (1,2)	73,4
>10	Sonstige	-	426 (26,6)	100

^a Assoziierte MLST wie auf <http://spaserver.ridom.de> veröffentlicht

^b Vgl. frühere Veröffentlichungen (Köck et al., 2009)

^c Vgl. frühere Veröffentlichungen (Nienhoff et al., 2009)

^d Diese Studie

Tabelle 7: die zehn häufigsten spa-klonalen Komplexe nach BURP-Analyse dieser Studie. Zur graphischen Darstellung der BURP-Analyse siehe hierzu Abbildung 8 bis Abbildung 13

Rang	MRSA-Isolate		
	spa-klonaler Komplex	Häufigkeit, Anzahl (%)	kumulative Häufigkeit, %
1	spa-CC 003	846 (52,8)	52,8
2	spa-CC 032	431 (26,9)	79,9
3	spa-CC 008	97 (6,1)	85,8
4	spa-CC 011	86 (5,4)	91,2
5	spa-CC 012	22 (1,4)	92,6
6	spa-CC 655	20 (1,2)	93,8
7	spa-CC 004	18 (1,1)	94,9
8	spa-CC 127	10 (0,6)	95,5
9	spa-CC 044	8 (0,5)	96
10	spa-CC 690-692	4 (0,2)	96,2
>10	Sonstige	61 (3,8)	100

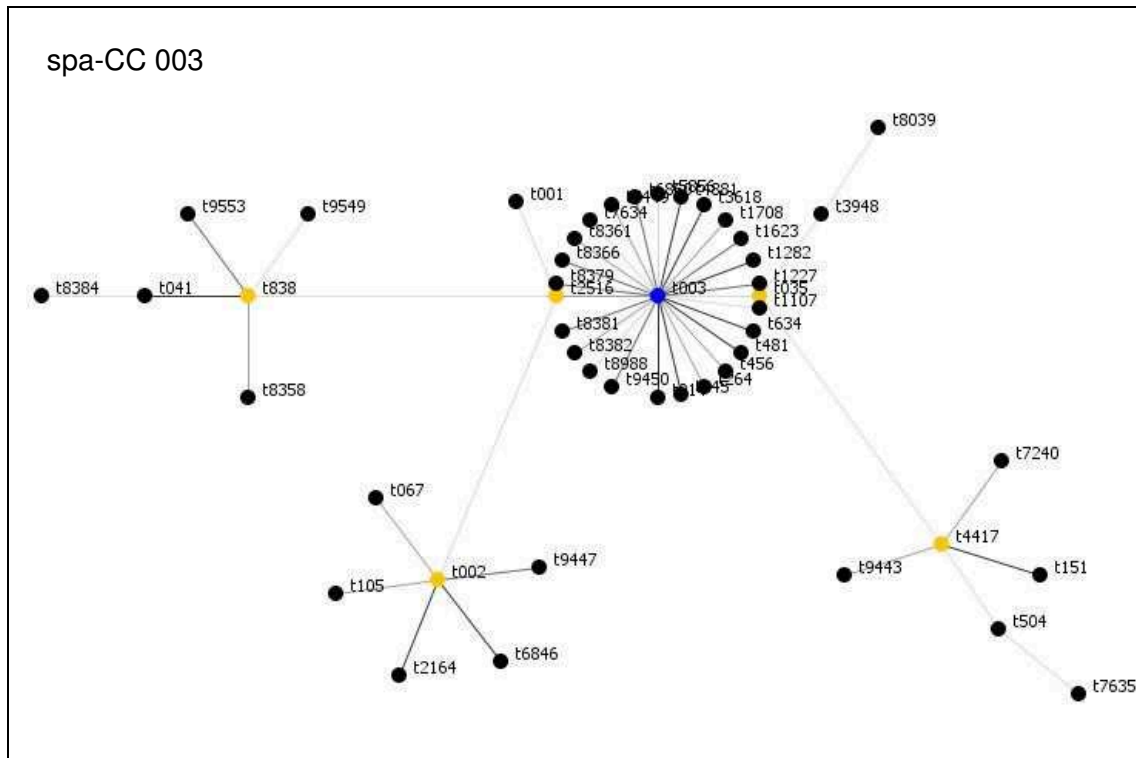


Abbildung 8: verwandte *spa*-Typen nach BURP-Analyse für *spa*-CC 003. Blau: Gründer (founder) des *spa*-klonalen Komplexes; gelb: Gründer der Untergruppe des *spa*-klonalen Komplexes.

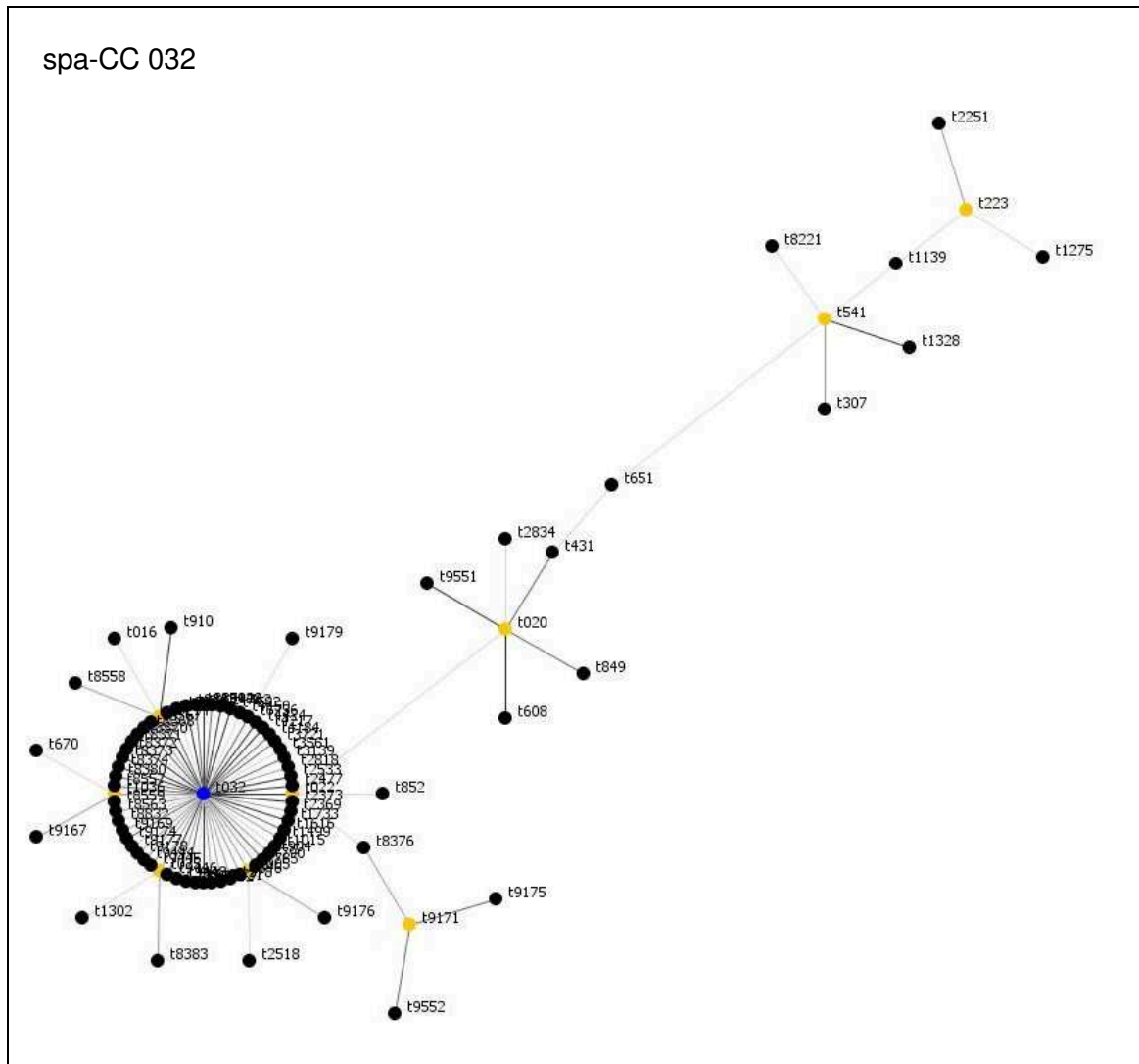


Abbildung 9: verwandte *spa*-Typen nach BURP-Analyse für *spa*-CC 032. Blau: Gründer (founder) des *spa*-klonalen Komplexes; gelb: Gründer der Untergruppe des *spa*-klonalen Komplexes.

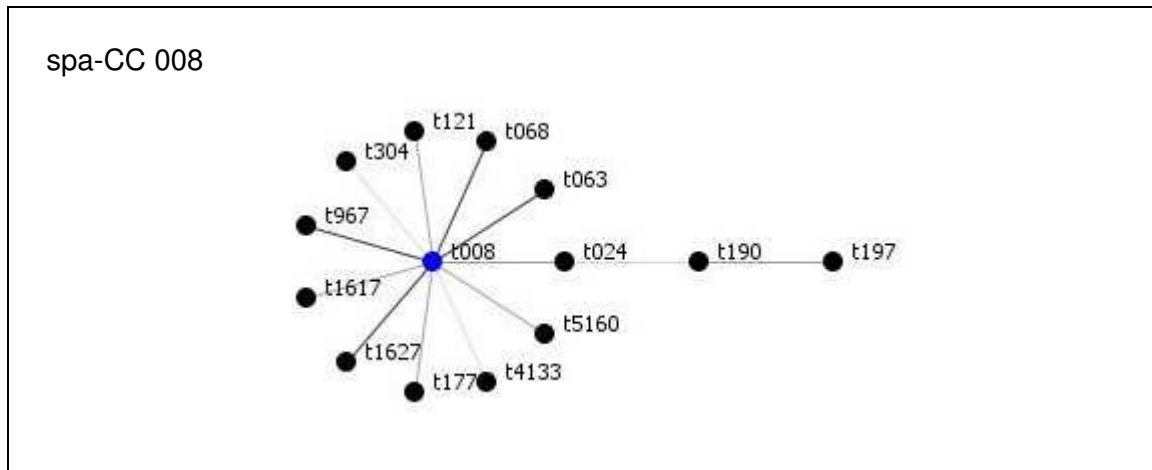


Abbildung 10: verwandte *spa*-Typen nach BURP-Analyse für spa-CC 008.
Blau: Gründer (founder) des *spa*-klonalen Komplexes

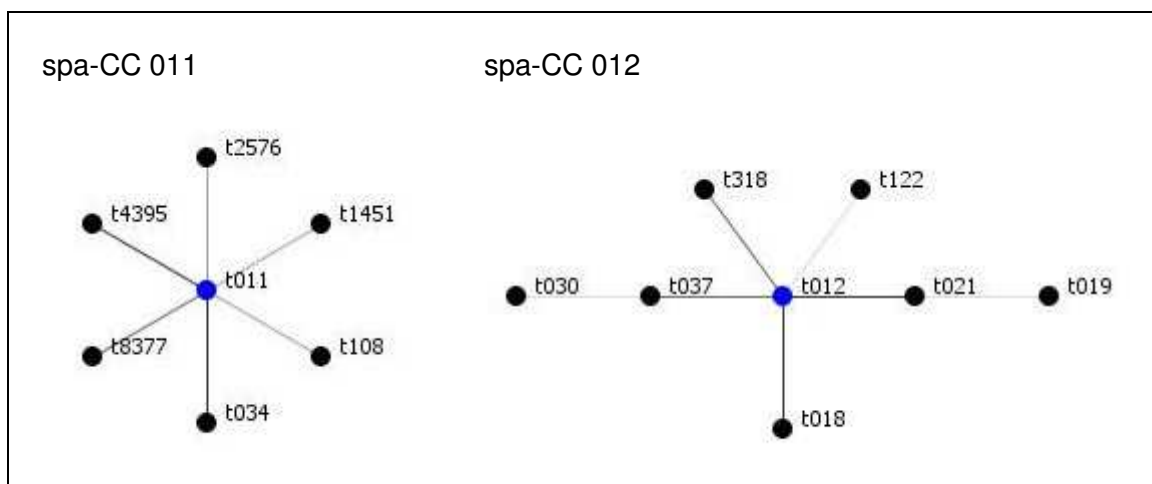


Abbildung 11: verwandte *spa*-Typen nach BURP-Analyse für spa-CC 011 und spa-CC 012. Blau: Gründer (founder) des *spa*-klonalen Komplexes

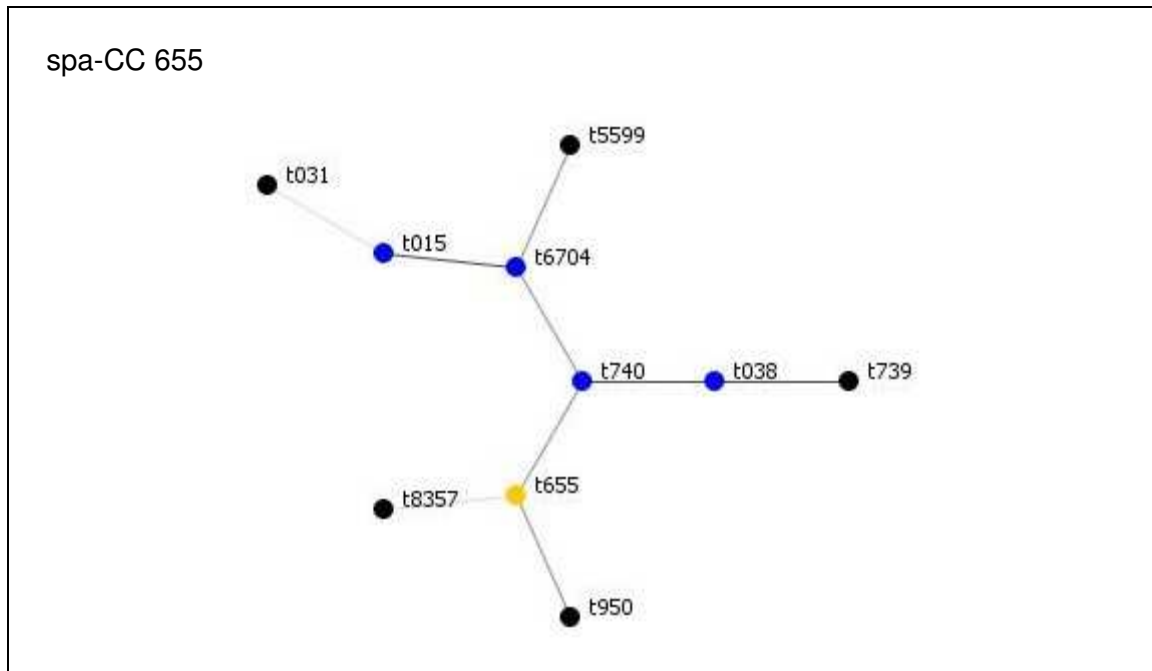


Abbildung 12: verwandte *spa*-Typen nach BURP-Analyse für spa-CC 655.

Blau: Gründer (founder) des *spa*-klonalen Komplexes; gelb: Gründer der Untergruppe des *spa*-klonalen Komplexes.

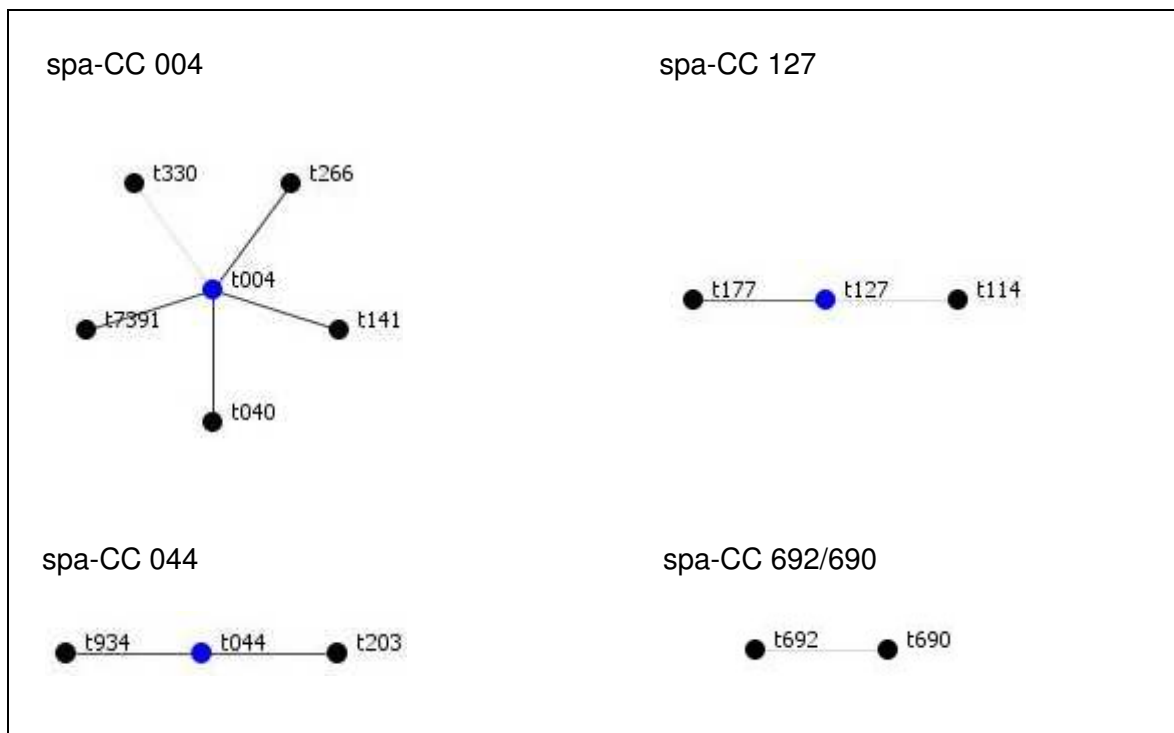


Abbildung 13: verwandte *spa*-Typen nach BURP-Analyse der spa-CCs 004, spa-CC 127, spa-CC 044 und spa-CC 692/690.

Blau: Gründer (founder) des *spa*-klonalen Komplexes.

3.2.2 REGIONALE UNTERSCHIEDE IN DER SPA-TYPISIERUNG

Da die teilnehmenden Zentren deutschlandweit verteilt waren, konnten wir regionale Häufungen einzelner *spa*-Typen in Deutschland beobachten. Die jeweils drei häufigsten *spa*-Typen der einzelnen Zentren werden in Tabelle 8 verglichen. Bei allen Zentren gehörte mindestens einer der drei häufigsten *spa*-Typen des Gesamtkollektivs (t003, t032, t008) auch zu den drei häufigsten *spa*-Typen des Zentrums. In 21 Zentren war t003 der häufigste *spa*-Typ. In sieben Zentren dominierte t032 (Dresden, Hamburg, Kiel, Bochum, Cottbus, München, Hamburg). In zwei Zentren wurde t008 am häufigsten gefunden (Stuttgart, Ravensburg). In Hannover überwog der Typ t034, in Stuttgart t002 und in Münster Typ t011.

Insgesamt dominierte in Süd- und Westdeutschland der *spa*-Typ t003, im Osten und Norden Deutschlands vor allem Typ t032 und in Mitteldeutschland die *spa*-Typen t034 und t011 (siehe Abbildung 14). Der *spa*-Typ t008 war vor allem in Süddeutschland verbreitet. In Nord- und Süddeutschland wurden vermehrt die bisher seltenen Typen t4217, *spa*-CC 032 (Norddeutschland, n=12) und t4881, *spa*-CC 003 (Südwestdeutschland, n=8) gefunden.

Tabelle 8: die häufigsten *spa*-Typen nach Zentren sortiert

Nr.	Zentrum	Rang der häufigsten <i>spa</i> -Typen (%)		
		1	2	3
1	Stuttgart	t008 (20)	t002, t003 (je 17)	t032 (12,5)
2	Wiesbaden	t003 (65,3)	t032 (10,2)	t045 (6,1)
3	Homburg	t003 (64)	t4881 (12)	t504 (8)
4	Hannover	t034 (49)	t011 (26,5)	t032 (6,1)
5	Heidelberg	t003 (71,4)	t032 (6,1)	t008 (4,1)
6	Hamburg	t032 (38,8)	t003 (12,2)	t008 (6,1)
7	Mönchengladbach	t003 (46,9)	t032 (12,2)	t264, t038, t008, t002 (je 4,1)
8	Stuttgart	t002 (27,7)	t003, t008 (je 23,4)	t011 (4,3)
9	München	t003 (28)	t032 (20)	t011 (8)
11	Münster	t011 (20,4)	t003, t032 (je 14,3)	t8374 (8,2)
12	Dresden	t032 (46)	t003 (22)	t014 (8)
13	Köln	t003 (54)	t032 (18)	t045 (4)
14	Würzburg	t003 (60)	t002, t1227 (je 6)	t008, t014, 7032, t7391 (je 4)
15	Moers	t003 (42)	t032 (20)	t068, t264, t8374 (je 4)
16	Bochum	t032 (27,1)	t003 (22,9)	t022 (6,3)

17	Erlangen	t003 (56,5)	t045 (6,5)	t002 (4,3)
18	Köln	t003 (58)	t032 (14)	t014, t463 (je 4)
19	Ravensburg	t008 (30)	t003 (16)	t002 (10)
20	Bonn	t003 (76)	t008, t014, t032 (je 4)	
22	Koblenz	t003 (72)	t045 (4)	
23	Ludwigshafen	t003 (70)	t4417 (6)	t008, t045, t1227, t5856 (je 4)
24	Jena	t003 (31)	t032 (12,8)	t034 (6,4)
25	Kiel	t032 (28)	t4217 (24)	t003 (20)
27	Bad-Oeynhausen	t003 (24,7)	t8374 (10,2)	t032, t034, t114 (je 6,1)
28	Freiburg	t003 (20)	t002 (14)	t032 (12)
29	Cottbus	t032 (38,8)	t003 (14,4)	t004 (8,2)
30	Frankfurt	t003 (55,6)	t032 (13,3)	t008 (4,4)
31	Rheinbach	t003 (67,4)	t008 (9,3)	t032 (7)
32	Bochum	t003, t032 (je 36,7)	t008 (4,1)	
33	Mainz	t003 (50)	t045 (8,3)	
34	München	t032 (22)	t003 (18)	t002 (8)
35	Aachen	t003 (50)	t032 (20,8)	t045, t264 (je 4,2)
36	Hamburg	t032 (32)	t003 (24)	t2373, t8374, t849 (je 4)

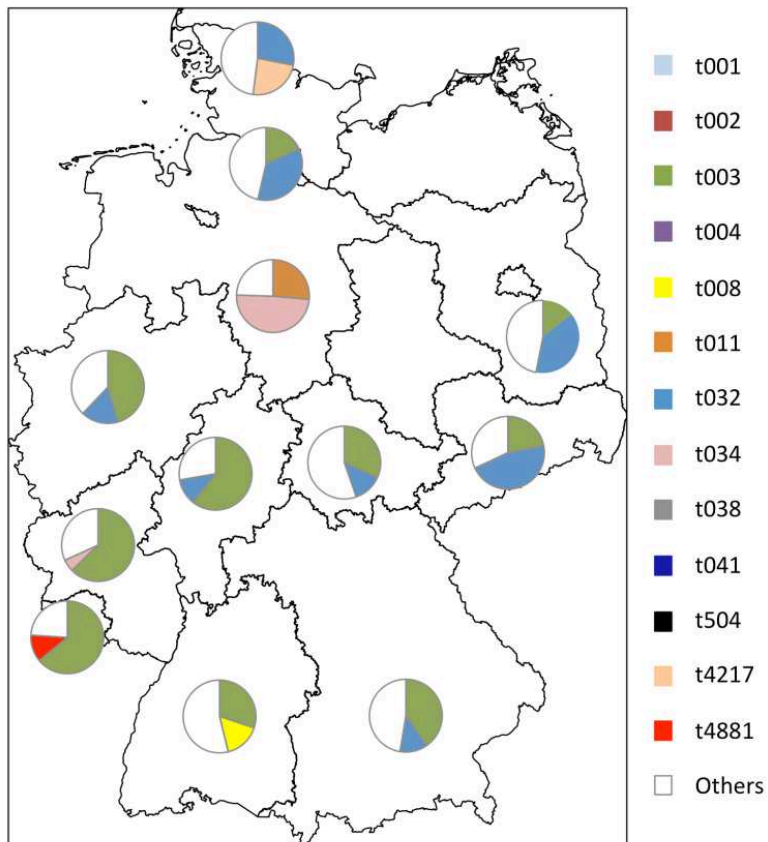


Abbildung 14: Übersicht über die beiden häufigsten *spa*-Typen nach Bundesländern (Schaumburg et al., 2012). Es werden die beiden häufigsten *spa*-Typen der Zentren aus dem jeweils selben Bundesland zusammengefasst.

3.2.3 VERTEILUNG DER SPA-TYPEN NACH RISIKOFAKTOREN

Um epidemiologische und molekulare Ergebnisse miteinander zu vergleichen, bestimmten wir für die beiden Gruppen „nosokomial erworbene MRSA“ (n=699) und „ambulant erworbene MRSA“ (n=150) die jeweils häufigsten *spa*-Typen (Abbildung 15). Die übrigen Isolate konnten aufgrund fehlender Angaben keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden. Insgesamt war die Verteilung der *spa*-Typen in den beiden Gruppen sehr ähnlich. Ein signifikanter Unterschied bestand lediglich für den *spa*-Typ t034, welcher anteilmäßig signifikant häufiger bei ambulant erworbenen (4,6%; n=7), als bei nosokomialen Isolaten (0,9%; n=6; OR=1,78; KI: 0,06-0,53; p=0,003) vorkam.

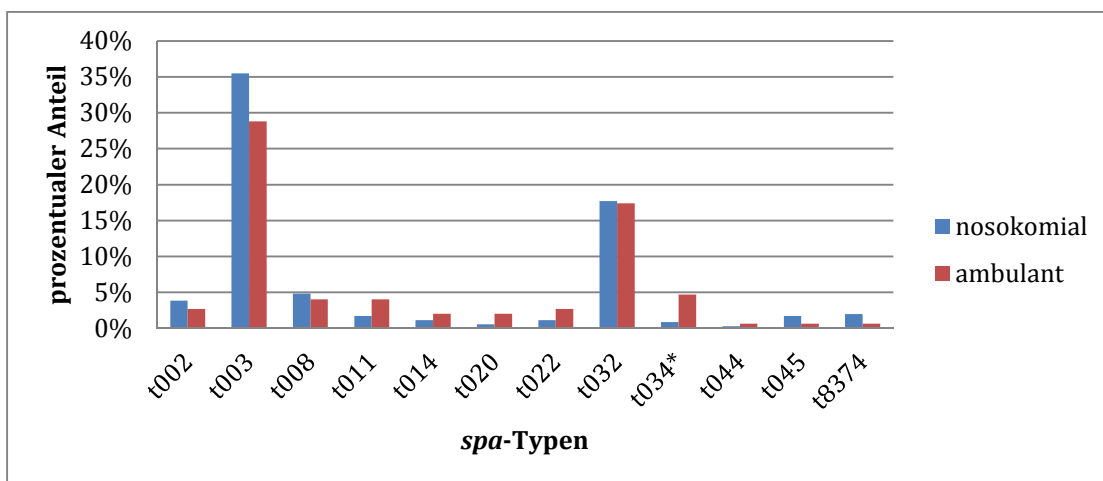


Abbildung 15: Verteilung der häufigsten *spa*-Typen bei ambulant und nosokomial erworbenen MRSA, Angaben in %. In beiden Gruppen kommt t003 am häufigsten vor. Ein signifikanter Unterschied besteht für t034, welcher häufiger bei ambulant erworbenen MRSA-Besiedelungen vorkam. Für 754 Patienten gibt es keine Angaben zu Risikofaktoren. * Unterschied signifikant, OR=1,78; KI: 0,06-0,53; p=0,003

3.2.4 ASSOZIATION VON SPA-TYPEN MIT KLINISCH RELEVANTEN INFEKTIONEN

Mithilfe der Angaben zu vorhandenen Infektionen konnten wir in 1030 Fällen die vorherrschenden *spa*-Typen bei Isolaten symptomatischer und asymptomatischer MRSA-Träger miteinander vergleichen (siehe Tabelle 9). In beiden Gruppen ist t003 (mit Infektion n=206; ohne Infektion n=192) der häufigste *spa*-Typ, gefolgt von t032 (mit Infektion n=101; ohne Infektion n=72). An dritter Stelle steht bei asymptomatischen Trägern *spa*-Typ t002 (n=14), bei symptomatischen Trägern t008 (n=31). Insgesamt ist die Verteilung der *spa*-Typen bei Isolaten von Infektionen und asymptomatischen Besiedelungen

ähnlich. Signifikante Unterschiede bestanden nur für *spa*-Typ t008 (n=44), der häufiger mit Infektionen assoziiert war und die *spa*-Typen t034 (n=11) und t011 (n=16), welche öfter von Patienten ohne Symptome isoliert wurden (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Die zehn häufigsten *spa*-Typen mit Angaben zu assoziierter Infektion

<i>spa</i> -Typ	Anteil an Isolaten mit assoziierter Infektion (n=547, Angaben in %)	Anteil an Isolaten ohne assoziierte Infektion (n=483, Angaben in %)	odds ratio (95% KI)	p-Wert
t003	36,6	39,8	0,87 (0,68-1,12)	0,304
t032	18,5	14,9	1,29 (0,93-1,8)	0,133
t008	5,7	2,7	2,17 (1,12-4,2)	0,02*
t002	4,4	2,9	1,54 (0,79-3,01)	0,247
t8374	1,6	2,1	0,79 (0,32-1,96)	0,649
t045	1,5	2,3	0,64 (0,25-1,6)	0,361
t022	1,5	1,2	1,18 (0,41-3,43)	0,795
t014	1,3	1,2	1,03 (0,34-3,09)	1,000
t011	0,5	2,7	0,2 (0,06-0,7)	0,009*
t034	0,4	1,9	0,19 (0,04-0,9)	0,03*

* Unterschied statistisch signifikant

3.3 CHARAKTERISIERUNG DER MRSA-EXOPROTEINE

3.3.1 VORKOMMEN VON VIRULENZFAKTOREN

Alle Isolate wurden auf vorhandene Virulenzfaktoren getestet. Pro Isolat wurden ein bis sechs Virulenzfaktoren gefunden, der Mittelwert vorhandener Virulenzfaktoren war 4 (± 1 ; Spannweite: 1-6 Virulenzfaktoren; Median: 4; siehe Abbildung 16)

Bei allen Isolaten konnte das *hlg*-Gen nachgewiesen werden. Mindestens ein Enterotoxingen kodierten 93% (n=1491) aller Isolate. Das häufigste Gen war *sei*, welches 85,2 % (n=1366) aller Isolate besaßen, gefolgt von *seg* mit 85,0 % (n=1363; siehe Tabelle 10). Bei 84,9% aller Isolate (n=1361) waren *seg* und *sei* in Kombination vorhanden. Auch die Enterotoxingene *sed* (n=803; 50%) und *sej* (n=762; 47,5%) wurden in den meisten Fällen gemeinsam kodiert (46,4% aller Isolate; n=744). Somit kamen beide Kombinationen zwar häufig, aber nicht ausschließlich vor. Gene welche das Staphylokokken Enterotoxin E (*see*) kodieren, wurden nicht gefunden, bei 112 Isolaten konnte kein Enterotoxingen detektiert werden.

Das Exfoliativtoxigen *etd* kam bei 0,5% (n=8) der Isolate vor, *eta* und *etb* wurden nicht gefunden. Ebenfalls acht Isolate kodierten *edin-B*, *edin-A* kam einmal vor. Das Gen, welches den Zelldifferenzierungsfaktor C (*edin-C*) kodiert, wurde nicht detektiert. Sieben der acht Isolate (87,5%) welche *edin-B* kodierten, kodierten auch *etd*.

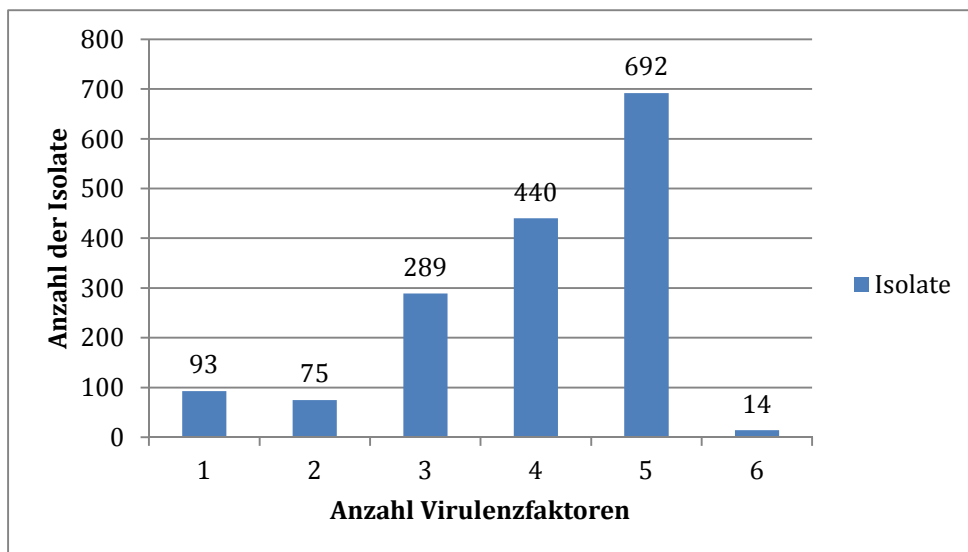


Abbildung 16: Verteilung der Anzahl vorhandener Virulenzfaktoren im Gesamtkollektiv, n=1603. Im Mittel hatten die Isolate 4 (± 1) Virulenzfaktoren, Spannweite: 1-6; Median: 4.

Tabelle 10: Häufigkeit und Verteilung der getesteten Virulenzfaktoren

Virulenzfaktor	MRSA-Isolate; n=1603, Anzahl (%)
<i>lukS-PV/lukF-PV</i>	44 (2,7)
<i>tst</i>	14 (0,9)
<i>sea</i>	105 (6,6)
<i>seb</i>	7 (0,4)
<i>sec</i>	322 (20,1)
<i>sed</i>	800 (49,9)
<i>seg</i>	1363 (85,0)
<i>seh</i>	11 (0,7)
<i>sei</i>	1366 (85,2)
<i>sej</i>	762 (47,5)
<i>eta</i>	0 (0)
<i>etb</i>	0 (0)
<i>etd</i>	8 (0,5)
<i>edin-A</i>	1 (0,06)
<i>edin-B</i>	8 (0,5)
<i>hlg</i>	1603 (100)

3.3.2 EXOTOXINGENE UND ASSOZIATION MIT INFEKTION

Wir verglichen bei Patienten mit Angaben zu Infektionen (n=1030) die Anzahl der Virulenzfaktoren ihrer MRSA-Isolate. Isolate aus infiziertem Gewebe hatten im Mittel 4,1 (± 1 ; Spannweite: 1-6) der getesteten Virulenzfaktoren, Isolate ohne Infektion 4 ($\pm 1,2$; Spannweite: 1-6), ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der kodierten Virulenzfaktoren und der Assoziation mit einer Infektion bestand nicht.

Es fiel auf, dass Isolate welche *sec* kodierten (n=227), signifikant seltener mit asymptomatischen Besiedlungen assoziiert waren als mit Infektionen (64,3%; n=146; OR=0,55; KI: 0,41-0,75; p<0,001).

Isolate, die *etd/edin-B* kodierten, waren vor allem mit Abszessen assoziiert (25%; n=2/8; OR=20,93; KI: 4,03-108,82; p=0,007).

3.4 SPA-TYPISIERUNG UND VIRULENZFAKTOREN

3.4.1 ENTEROTOXINGENE NACH SPA-CCS UND SPA-TYPEN

Um zu bestimmen, ob Gene für Enterotoxine abhängig von bestimmten *spa*-CCs und *spa*-Typen auftraten, haben wir die Isolate mit den sieben häufigsten *spa*-CCs beziehungsweise den zehn häufigsten *spa*-Typen mit dem Vorkommen der häufigsten Enterotoxingene (*sea*, *sec*, *sed/sej*, und *seg/sei*) verglichen. Für die häufig in Kombination vorkommenden Gene (*sed/sej* und *seg/sei*) wurde das Vorkommen des jeweils erstgenannten Gens repräsentativ für beide Gene gewählt. Die *spa*-CCs und *spa*-Typen besaßen teilweise mehrere Gene für Enterotoxine (siehe Abbildung 17).

Es zeigte sich eine deutliche Assoziation zwischen *spa*-Typen (und *spa*-CCs) und dem Toxinprofil einzelner Isolate. Der *spa*-CC 003 (t002, t003, t014, t045) war überwiegend mit *sed/sej* und *seg/sei* assoziiert. Isolate mit *spa*-CC 008 (t008) waren vor allem positiv für *sed/sej* und *sea*, Isolate mit *spa*-CC 032 für *seg/sei* und *sec*. Gene für SEH kamen nur in *spa*-CC 127 (t127) vor.

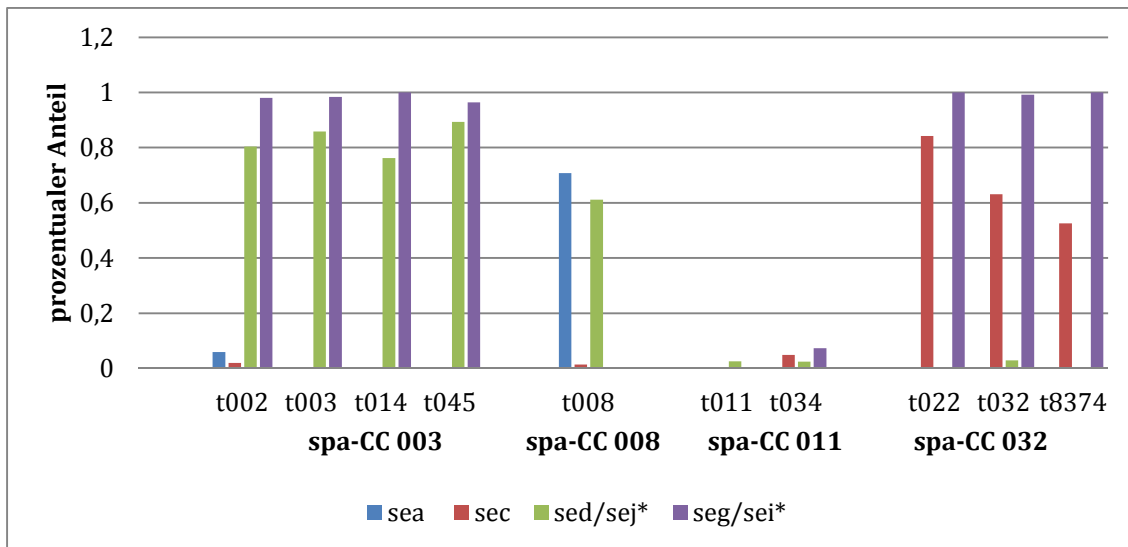


Abbildung 17: Anteil der Enterotoxingene bei den Isolaten mit den zehn häufigsten *spa*-Typen. Die Abbildung zeigt, wieviel Prozent der Isolate mit den häufigsten *spa*-Typen unserer Studie positiv für die häufigsten Enterotoxingene waren. Die *spa*-Typen sind nach ihren zugehörigen *spa*-CCs (CC003, 008, 011, 032) sortiert; Angaben in %. * Für die Kombinationen *sed/sej* und *seg/sei* wurden die Zahlen für das jeweils erstgenannte Gen verwendet.

3.4.2 *SPA*-TYPEN DER *ETD*- UND *EDIN-B*-POSITIVEN ISOLATE

Die sieben Isolate, welche positiv für *etd* und *edin-B* waren, gehörten zu den *spa*-Typen t044 (n=5) und t203 (n=2; beide *spa*-CC 044). Das Isolat, welches isoliert für *etd* positiv war, hatte den *spa*-Typ t304, das *edin-B*-positive Isolat hatte t355 (siehe Abbildung 18).

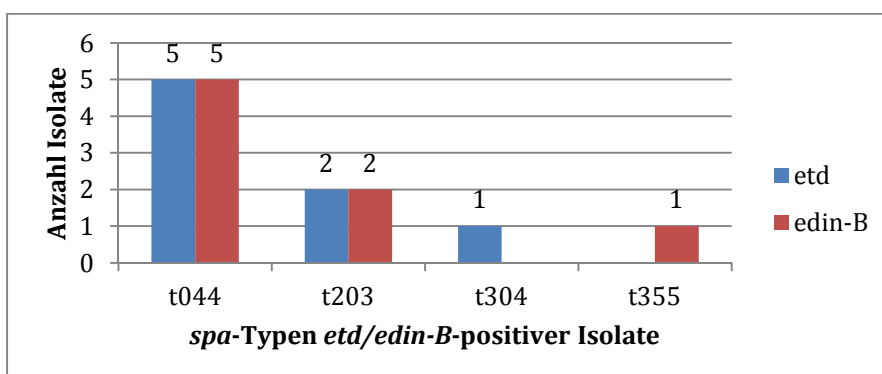


Abbildung 18: Assoziation von *spa*-Typen und *etd/edin-B*. Die Abbildung zeigt die *spa*-Typen von *etd*- und *edin-B*-positiven Isolaten (n=9).

3.4.3 SPA-TYPEN UND DAS GEN FÜR DAS „TOXIC SHOCK SYNDROME“ TOXIN (TSST)

Insgesamt kodierten 14 Isolate *tst*. Diese Isolate gehörten zu neun verschiedenen *spa*-Typen. Alle Isolate mit den *spa*-Typen t012 (n=4) und t223 (n=3) waren *tst*-positiv. Die restlichen *tst*-positiven Isolate hatten die *spa*-Typen t003, t018, t021, t045, t122, t283, t8378 (je n=1; siehe Abbildung 19). Isolate, die zu *spa*-CC 012 (t012, t018, t021, t122) gehörten (n=22), waren signifikant häufiger *tst*-positiv als alle anderen Isolate (31,8%; n=7; OR=104,93; KI: 32,75-336,25; p<0,001). In *spa*-CC 003 (t003, t045) und *spa*-CC 032 (t223, t8374) kamen ebenfalls *tst*-positive Isolate vor, jedoch ohne signifikante Häufung.

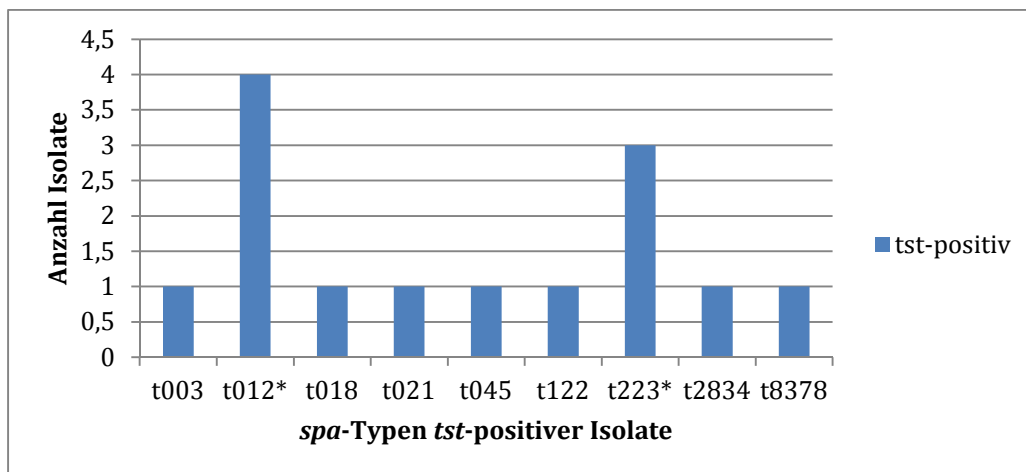


Abbildung 19: Assoziation von *spa*-Typen und *tst* (n=14). * Diese *spa*-Typen (t012 und t223) gehören zu *spa*-CC 012, in dem eine signifikante Häufung von *tst* zu beobachten war (OR=104,93; KI: 32,75-336,25; p<0,001)

3.5 AGR-SUBTYPEN

Der häufigste *agr*-Subtyp war *agrII* mit 54,3% der Isolate (n=870), gefolgt von *agrI* (43,4%; n=696) und *agrIII* (2,2%; n=35), *agrIV* wurde nicht detektiert. Für zwei Isolate konnte kein *agr*-Typ bestimmt werden (beide *spa*-Typ t022). Keiner der *agr*-Subtypen war vermehrt mit Infektionen assoziiert.

3.5.1 ASSOZIATION VON SPA-TYPEN MIT AGR-SUBTYPEN

Um eine mögliche Korrelation zwischen bestimmten *spa*-Typen und *agr*-Subtypen festzustellen, verglichen wir die 1173 Isolate mit den zehn häufigsten *spa*-Typen unserer

Studie mit ihrem *agr*-Typ. Jedes dieser Isolate konnte *agrI* oder *agrII* zugeordnet werden (siehe Abbildung 20). Die *spa*-Typen t032, t008, t034, t011 und t8374 hatten ausschließlich *agrI*. Von *spa*-Typ t022 gehörten 17 Isolate zu *agrI*, zwei Isolate konnten keinem *agr*-Subtypen zugeordnet werden. Typ t014 und t045 wurden ausschließlich in *agrII* gefunden. Auch von den *spa*-Typen t003 und t002 konnte die große Mehrheit *agrII* zugeordnet werden, nur jeweils ein Isolat gehörte zu *agrI*. Der Typ *agrIII* wurde bei unterschiedlichen *spa*-Typen gefunden. Die vier häufigsten, die alle ausschließlich zu *agrIII* gehörten, waren t044, t127 (je n=5), t318 und t012 (je n=4).

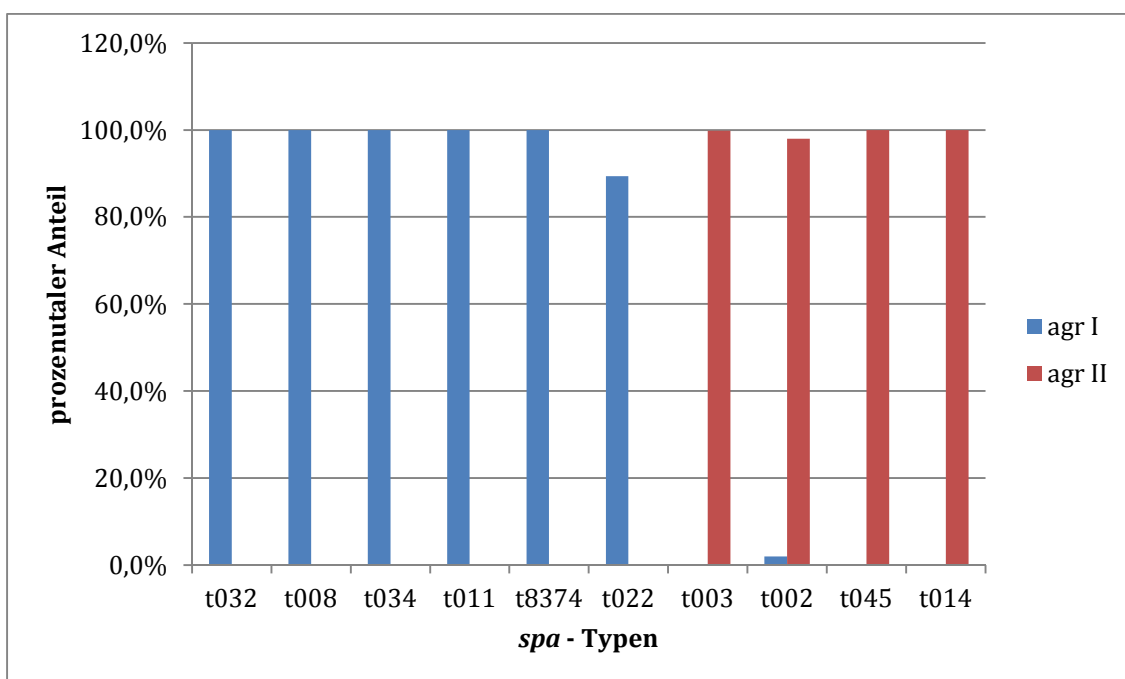


Abbildung 20: Anteil der *agr*-Subtypen an den Isolaten mit den zehn häufigsten *spa*-Typen.

3.5.2 ASSOZIATION VON TOXINGENEN MIT AGR-SUBTYPEN

Wir haben analysiert, ob es in unserem Kollektiv Zusammenhänge zwischen der Kodierung bestimmter Toxingene von *S. aureus* und der *agr*-Subtypenzugehörigkeit gibt (siehe Abbildung 21). Das Gen *sea* kam bei allen *agr*-Subtypen gleich häufig vor. Fünf der sieben Isolate mit *seb* hatten *agrI*, aufgrund der geringen Zahl kann aber keine Aussage über die Signifikanz gemacht werden.

Der *agr*-Subtyp I war vor allem mit *sec* assoziiert (OR=254,97; KI: 81,28-799,82; $p < 0,001$), Subtyp II mit *sed/sej* (OR=44,9; KI: 33,28-60,58; $p < 0,001$). Der *agr*-Subtyp III

war signifikant assoziiert mit den Genen *seh* (OR=718,21; KI: 89,15-5785,97; $p < 0,001$), *tst* (OR=77,14; KI: 25,05-237,55; $p < 0,001$) und *etd/edin-B* (OR=391,75; KI: 46,6-3291,1; $p < 0,001$).

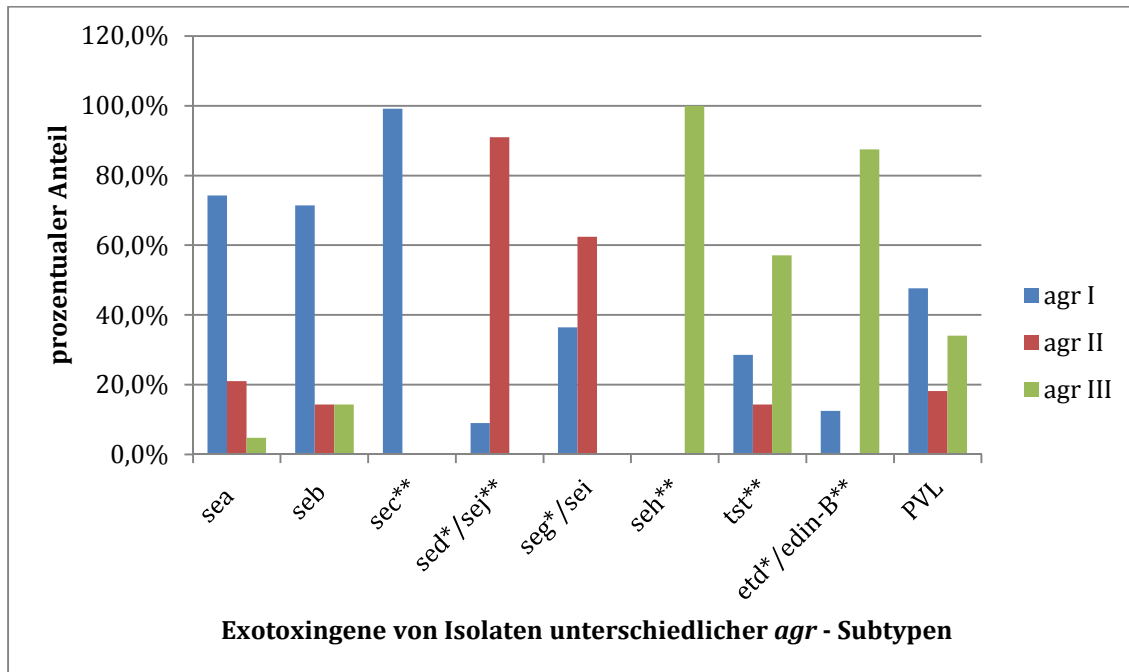


Abbildung 21: Assoziation der *S. aureus* Exotoxingene mit den *agr*-Subtypen I-III. Gezeigt wird das gemeinsame Auftreten von Virulenzfaktoren und den *agr*-Subtypen (Angaben in Prozent) * Bei den kombinierten Exotoxingenen wurden die Prävalenzen des erstgenannten Gens verwendet. ** Es besteht eine signifikante Assoziation zwischen *agr*-Subtyp I und *sec*, *agr*-Subtyp II und *seg/sei* und *sed/sej* und *agr*-Subtyp III und *seh*, *tst* und *etd/edin-B* (für alle: $p < 0,001$).

3.6 PVL-POSITIVE MRSA (CA-MRSA)

Insgesamt waren 2,7% ($n=44/1603$) der MRSA-Isolate PVL-positiv und konnten zu CA-MRSA gezählt werden. Sie waren in vier Haupt *spa*-CCs vorhanden (*spa*-CC 003, 008, 012, 03). Davon gehörten zehn Isolate zu dem *spa*-Typ t008, der auch beim hypervirulenten PVL-positiven CA-MRSA "USA300" vorkommt, fünf zu t044 (USA400) und vier Isolate hatten den *spa*-Typ t002. Die restlichen PVL-positiven Isolate hatten die *spa*-Typen t318 ($n = 4$), t437 ($n=3$), t003, t019, t203, t4741 (je $n=2$), t005, t016, t045, t657, t692, t791, t967, t2518, t7656 und t8376 (je $n=1$). Für verwandte *spa*-Typen nach BURP-Analyse siehe hierzu Abbildung 22.

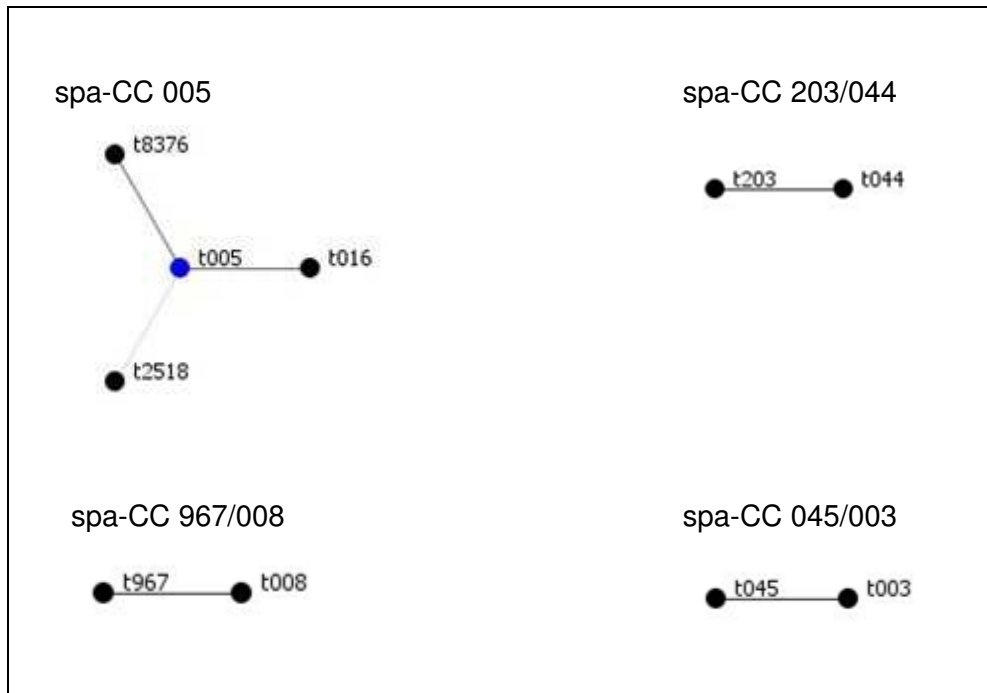


Abbildung 22: spa-klonale Komplexe (spa-CCs) nach BURP-Analyse der *spa*-Typen der PVL-positiven Isolate. Isolate mit den *spa*-Typen t002, t019, t437, t657, t692, t791, t4741, t7656 waren singeltons. Kein *spa*-Typ wurde ausgeschlossen. Blau: Gründer (founder) des spa-CCs.

Die PVL-positiven MRSA wurden zu 76,5% (n=26 von 34 mit Angaben zu Infektion) aus Infektionen isoliert und signifikant seltener von asymptomatischen Trägern (23,5%; n=8/34; OR=0,34; KI: 0,15-0,75; p=0,008). Bei acht Isolaten war nicht bekannt, ob sie mit einer Infektion assoziiert waren. Die Infektionen waren Haut- und Weichgewebeeinfektionen (n=10), Abszesse (n=9), postoperative Wundinfektionen (n=1) und Harnwegsinfektionen (n=1). Bei fünf Isolaten wurde die Infektion nicht genauer ausgeführt. Im Vergleich zum Gesamtkollektiv wurden CA-MRSA insbesondere häufiger von Abszessen isoliert (OR=22,01; KI: 9,25-52,41; p<0,001). So waren 20,5% (n=9/44) der PVL-positiven Isolate mit Abszessen assoziiert, von den PVL-negativen Isolaten nur 1,2% (n=18/1559). Die mittlere Anzahl von Risikofaktoren für die Besiedlung mit HA-MRSA war bei Personen mit PVL-positiven Isolaten 0,8 ($\pm 0,9$; Spannweite: 0-3) und bei PVL-negativen Isolaten 1,9 ($\pm 1,2$; Spannweite: 0-5). Der Unterschied ist statistisch signifikant (Mittlere Differenz: 1,08; KI: 0,55-1,6; p<0,001).

Die für die Besiedlung mit HA-MRSA typischen Risikofaktoren „Krankenhausaufenthalt in den letzten 12 Monaten“ (OR=0,21; KI: 0,07-0,58; p<0,001) sowie „mehr als 48h

hospitalisiert vor MRSA-Nachweis“ (OR=0,3; KI: 0,09-0,96; p=0,032) kamen bei PVL-positiven Isolaten seltener vor als bei PVL-negativen (siehe Tabelle 11).

PVL-positive Isolate besaßen außer *lukS-PV/lukF-PV* noch einen bis fünf weitere Virulenzfaktoren (Mittelwert: 2,9 ($\pm 1,4$)) und hatten damit weniger zusätzliche Virulenzfaktoren als PVL-negative Isolate (Mittelwert: 4 ($\pm 1,2$); Spannweite 1-6; Mittlere Differenz: 1,14; KI: 0,79-1,49; p<0,001).

Die PVL-positiven Isolate waren mit *seb* (9,1%) assoziiert, außerdem waren alle Isolate mit *etd/edin-B* auch PVL-positiv. Die Gene *seg/sei* (47%), *sed/sej* (18,2%) und *sec* (4,5%) waren bei PVL-positiven Isolaten seltener als bei PVL-negativen Isolaten, keines der PVL-positiven Isolate trug das TSST-1-Gen (Abbildung 23).

Tabelle 11: Risikofaktoren für nosokomial erworbene MRSA bei PVL-positiven Isolaten

	PVL-positive MRSA, n=44 Anzahl (%)	PVL-negative MRSA, n=1559 Anzahl (%)	odds ratio (95% KI)	p-Wert
Vorherige MRSA- Infektion/Kolonisation bekannt	4 (9,1)	215 (13,8)	0,63 (0,2-1,8)	0,505
Mehr als 48 Std. hos- pitalisiert vor Nach- weis des 1. MRSA- Isolats	3 (6,8)	309 (19,8)	0,30 (0,09-0,96)	0,032*
Hämo- oder Peritonealdialyse in- nerhalb der letzten 12 Monate	1 (2,3)	58 (3,7)	0,60 (0,08-4,45)	0,615
chirurgischer Eingriff in den letzten 12 Mo- naten	4 (9,1)	303 (19,4)	0,42 (0,15-1,17)	0,117
Krankenhausaufent- halt in den letzten 12 Monaten	4 (9,1)	508 (32,6)	0,21 (0,07-0,58)	<0,001*
Aufenthalt in einer Pflege-, Alten- oder Rehainrichtung in den letzten 12 Mona- ten	1 (2,3)	136 (8,7)	0,24 (0,03-1,78)	0,172

* Unterschied statistisch signifikant

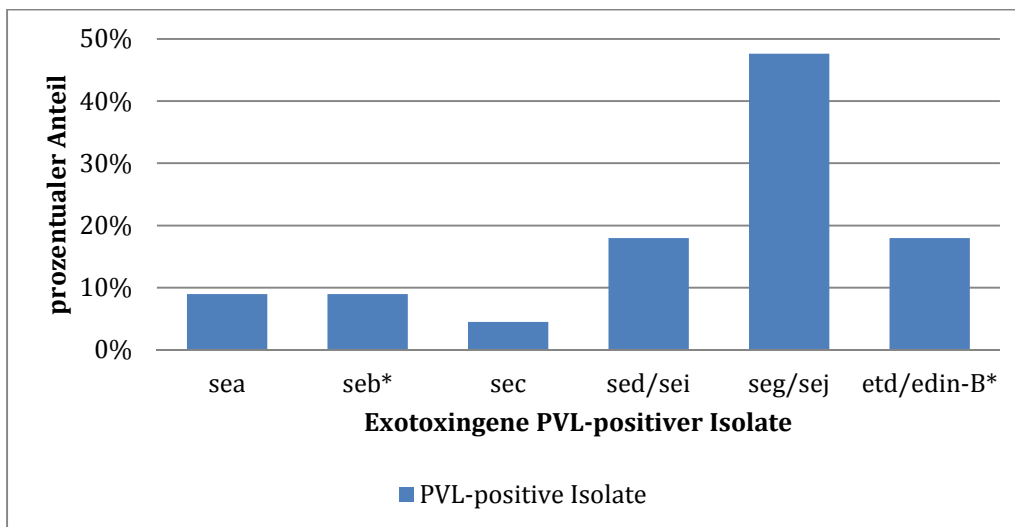


Abbildung 23: Exotoxigene bei PVL-positiven Isolaten (n=44). Die mit * markierten Gene *seb* und *etd/edinB* kamen signifikant häufiger bei PVL-positiven Isolaten vor ($p < 0,001$) als bei PVL-negativen Isolaten, die Gene *seg/sej* und *sec* waren seltener mit PVL assoziiert.

3.7 HA-MRSA

In unserem Kollektiv wiesen 55,3% (n=886) der Isolate einen der klassischen (PVL-negativen) HA-MRSA-*spa*-Typen t003 (n=637) und t032 (n=249) auf. Die meisten HA-MRSA assoziierten *spa*-Typen wurden aus Proben von Haut- und Weichgewebeeinfektionen isoliert (49,6%; n=116). Bei 13,9% (n=123) wurde die Infektion nicht näher bestimmt.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Isolaten von symptomatischen (53,2%; n=300) und asymptomatischen Trägern (46,7%; n=264) bei den 564 HA-MRSA-Isolaten mit Angaben zu klinischen Infektionen bestand nicht.

Patienten mit HA-MRSA hatten 0 bis 5 Risikofaktoren für den nosokomialen Erwerb von MRSA (Mittelwert: 1,9 ($\pm 1,3$)) und damit statistisch signifikant mehr Risikofaktoren als Patienten mit CA-MRSA (Mittelwert: 0,8 ($\pm 0,9$); Spannweite: 0-3; Mittlere Differenz: 1,11; KI: 0,58-1,64; $p < 0,001$; siehe Abbildung 24).

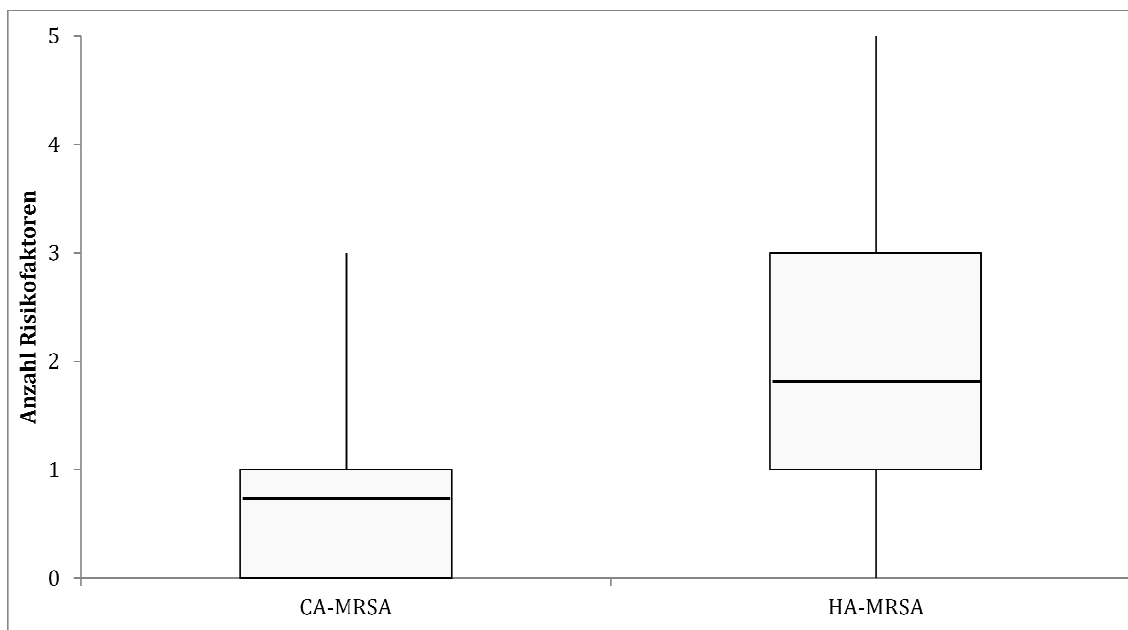


Abbildung 24: Box-Whisker-Plot der Anzahl der Risikofaktoren für den nosokomialen Erwerb von MRSA bei CA-MRSA und HA-MRSA. Der Mittelwert vorhandener Risikofaktoren bei Patienten mit CA-MRSA ist 0,8 ($\pm 0,9$; Spannweite 0-3), bei Patienten mit HA-MRSA 1,9 ($\pm 1,3$; Spannweite 0-5). Eingezeichnet ist der Mittelwert. Der Unterschied ist signifikant (Mittlere Differenz: 1,11; KI: 0,58-1,64; $p < 0,001$).

3.8 LA-MRSA

Für LA-MRSA typische, mit dem MLST ST398 assoziierte Isolate kamen im Gesamtkollektiv insgesamt 86mal vor (5,4%). Hierzu zählen MRSA-Isolate mit den *spa*-Typen t034 und t011 und gemäß der BURP-Analyse damit verwandte *spa*-Typen (t108, t1451, t2576, t4395t, t8377; siehe Abbildung 25). Diese haben wir in ganz Deutschland gefunden, den größten Anteil machten sie jedoch in Nordwestdeutschland aus (siehe Abbildung 26). In den Zentren dieser Region (Münster, Bad Oeynhausen, Hannover) lag der Anteil der LA-MRSA-*spa*-Typen bei 40,1% ($n=59/147$). In den restlichen Zentren bei 1,9% ($n=27/1456$; OR=35,48; KI: 21,44-58,72; $p < 0,001$).

Von allen 86 LA-MRSA-Isolaten waren neun (10,5%) mit einer klinisch relevanten Infektion assoziiert. Diese waren Haut- und Weichgewebeinfektionen ($n=4$), eine Fremdkörperinfektion ($n=1$), Sepsis ($n=1$), Pneumonie ($n=1$), postoperative Wundinfektion ($n=1$) und Endokarditis ($n=1$). Häufiger kamen MRSA-Isolate mit *spa*-CC 011 aber bei Isolaten ohne bekannten Zusammenhang mit einer Infektion vor (89,5%; $n=77$; OR=3,41; KI: 1,69-6,86; $p < 0,001$). Sie stammten aus Urin ($n=2$), Sputum ($n=3$) und Haut-/Schleimhautabstrichen ($n=72$). Die mittlere Anzahl der Virulenzfaktoren war bei den LA-MRSA-Isolaten (Mittelwert: 1,2 ($\pm 0,6$); Spannweite: 1-4) niedriger als im Ge-

samtkollektiv (Mittelwert: $4,2 \pm 1$; Spannweite 1-6; Mittlere Differenz: 3,01; KI: 2,88-3,15; $p < 0,001$).

Von allen ambulant erworbenen Infektionen und Besiedlungen (ohne im Fragebogen abgefragte Risikofaktoren für eine nosokomiale Infektion/Besiedlung mit MRSA) zählten 9,3% ($n=14/150$) zu den LA-MRSA-Typen. Insgesamt war LA-MRSA damit häufiger bei ambulanten Infektionen vertreten als bei stationär erworbenen Infektionen, bei denen 2,9% ($n=20/699$) LA-MRSA waren (OR=3,5; KI: 1,72-7,09; $p < 0,001$).

Interessanterweise hatten Isolate mit spa-CC 011 weniger Gene für Exotoxine (Mittelwert: $1,15 (\pm 0,58)$; Spannweite 1-4) als Isolate anderer spa-CCs (Mittelwert: $4,16 (\pm 0,96)$; Spannweite 1-6; Mittlere Differenz: 3,01; KI: 2,88-3,15; $p < 0,001$). Von den LA-MRSA-Isolaten kodierten 91,9% ($n=79/86$) kodierten nur *hlg*.

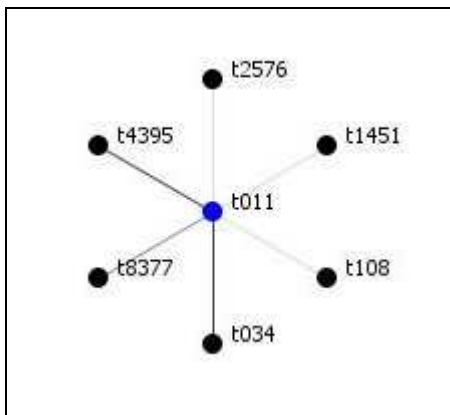


Abbildung 25: spa-klonale Komplexe (spa-CCs) nach BURP-Analyse der mit MLST ST398 assoziierten spa-Typen. Blau: Gründer (founder) des spa-CCs.

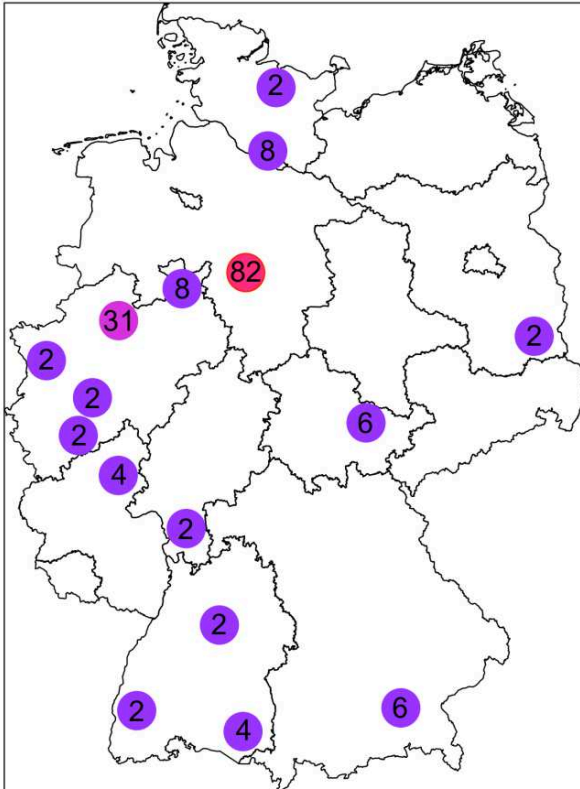


Abbildung 26: Verteilung von livestock-assoziierten MRSA innerhalb Deutschlands. Die Zahlen stehen für die Prävalenz (in Prozent) von LA-MRSA in den jeweiligen Studienzentren (Schaumburg et al., 2012).

3.8.1 LA-MRSA BEI PATIENTEN MIT NUTZ- UND HAUSTIERHALTUNG

Für jeden Patienten wollten wir wissen, ob er privat oder beruflich Kontakt zu Tieren hatte (Haus- bzw. Nutztierhaltung). Hierzu wurden für 211 Patienten Angaben gemacht, wovon 14,7% (n=31) Tierkontakt angaben. Davon hatten 26 Personen Kontakt zu Haustieren und 12 Personen Kontakt zu Nutztieren, sieben Patienten hatten Kontakt zu Haus- und Nutztieren (Mehrfachangaben möglich).

Bei den 31 Patienten mit Tierkontakt traten insgesamt fünfmal (16,1%) die mit LA-MRSA assoziierten Isolate mit dem spa-CC011 auf. Von den 12 Patienten mit Zuchtierkontakt hatten 33,3% (n=4) LA-MRSA. Bei Patienten mit Haustierkontakt (n=26) kam LA-MRSA bei 15,4% (n=4) der Patienten vor, von diesen vier hatten allerdings drei zusätzlich Kontakt zu Nutztieren. Damit sind Patienten mit Nutztierkontakt (33,3%) signifikant häufiger mit LA-MRSA besiedelt, als Patienten des Gesamtkollektivs (5,4 %; OR=1,09; KI: 0,03-0,37; p=0,003).

4 DISKUSSION

4.1 BEDEUTUNG UND EINORDNUNG DER STUDIE

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals repräsentativ für Deutschland in einer prospektiven, mehrzentrischen Studie die klonale Struktur und die Ausstattung mit Exotoxigenen von 1603 MRSA-Isolaten aus 33 Laboren mit mikrobiologischer Diagnostik. Es wurde eine Landkarte derzeit zirkulierender MRSA-Stämme in Deutschland erstellt und regionale Häufungen bestimmter Klone beobachtet. Ein besonderes Augenmerk legten wir hierbei auf die Prävalenz des ST398 LA-MRSA, die im Vergleich zu Vorstudien besonders im Westen Deutschlands deutlich gestiegen ist und die Prävalenz von CA-MRSA. CA-MRSA wurden in Zentren aus ganz Deutschland gefunden, waren mit einem Anteil von 2,7% (n=44) an allen MRSA-Isolaten jedoch recht selten. Im Vergleich zu früheren Studien (Schaumburg et al., 2012) hat der Anteil von „USA300“ CA-MRSA (*spa*-Typ t008) zugenommen und war bei uns der häufigste CA-MRSA-Typ (n=10).

Außerdem wurde für jedes MRSA-Isolat das Pathogenitätsprofil bestimmt. Da Virulenzfaktoren stark mit der genetischen Herkunft von MRSA-Klonen zusammenhängen, ändert sich mit der MRSA-Population auch die Virulenz der Erreger. Es ist wichtig, diese Veränderungen der Pathogenitätsprofile zusammen mit der genetischen Entwicklung von MRSA im Auge zu behalten und gegebenenfalls eine Veränderung des Virulenzprofils frühzeitig zu erkennen.

Das nationale Referenzzentrum für Staphylokokken (NRZ) am Robert-Koch-Institut hat für das Jahr 2010 ebenfalls *spa*-Typen, Anteile von LA- und CA-MRSA und teilweise Toxingenprofile von MRSA-Isolaten aus Deutschland untersucht (Robert-Koch-Institut, 2011). Die im NRZ ausgewerteten MRSA-Isolate werden jedoch unsystematisch von interessierten Laboren, Arztpraxen und Kliniken eingesandt, beispielsweise um einen MRSA- Ausbruch aufzuklären (vergleiche „Hinweise für den Einsender“ für das NRZ, www.rki.de). Es handelt sich also um vom Einsender vorselektierte, retrospektiv erhobene Daten, deren Auswertungsergebnisse verzerrt werden können, wenn zum Beispiel einige Labore ein größeres Interesse an der Auswertung haben als andere oder nur Isolate einschicken, wenn eine ungewöhnliche MRSA-Epidemie aufgefallen ist („reporting bias“). Für unsere Studie haben hingegen systematisch Zentren in ganz Deutschland MRSA-Isolate konsekutiv gesammelt und eingeschickt. Durch die fehlende Vorselektion durch die Einsender vermieden wir das „reporting bias“. Außerdem haben wir für unsere prospektive Studie zunächst alle Daten erhoben und diese an-

schließlich analysiert, so dass unsere Ergebnisse die aktuelle Situation von MRSA-Stämmen repräsentativ für ganz Deutschland und ohne statistische Verzerrungen abbildet.

4.2 EPIDEMIOLOGIE

4.2.1 DEMOGRAPHISCHE DATEN

Mehr als 75% der in die Studie eingeschlossenen Personen waren über 50 Jahre alt, der Altersmittelwert war 65,3 Jahre, der Median 70,6 (siehe Kapitel 3.1). Dieses relativ alte Patientenkollektiv überrascht nicht, da MRSA für gewöhnlich bei älteren Patienten gefunden wird (Kupfer et al., 2010; Shukla et al., 2009). Allerdings wurde das Alter bisher nicht als unabhängiger Risikofaktor für eine MRSA-Besiedlung/Infektion identifiziert, da ältere Menschen insgesamt mehr Risikofaktoren für MRSA haben, wie beispielsweise häufigere Aufenthalte in Krankenhäusern und Pflegeheimen (Kupfer et al., 2010; Robert-Koch-Institut, 2010).

Da in allen Zentren MRSA-Isolate der ersten 50 Patienten mit positivem MRSA - Nachweis unabhängig vom Geschlecht gesammelt wurden, können wir mit unseren Daten Angaben zum Anteil von MRSA bei Männern und Frauen machen. In unserem Kollektiv waren signifikant mehr Männer (56%) mit MRSA besiedelt oder infiziert als Frauen (41,9%; siehe Kapitel 3.1). Das männliche Geschlecht wurde auch schon in anderen Studien als relevanter Risikofaktor für die Infektion mit MRSA beschrieben (Kupfer et al., 2010). Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass das für die vorliegende Studie gewählte Studiendesign nicht geeignet ist, Risikofaktoren für eine MRSA-Besiedlung/-Infektion zu identifizieren.

4.2.2 AMBULANTE UND STATIONÄRE VERSORGUNG DER PATIENTEN

In dieser Studie war der Anteil an MRSA-Isolaten von stationären Patienten höher als von ambulanten Patienten (77% versus 21% respektive). Von diesen stationär behandelten Patienten wurden 75 % der Patienten auf Normalstationen und 20% intensivmedizinisch betreut (siehe Kapitel 3.1.2). Die Daten des NRZ für Staphylokokken zur MRSA-Situation in Deutschland zeigen ebenfalls eine deutlich höhere Prävalenz von MRSA im stationären als im ambulanten Bereich. In der Datenbank des NRZ von 2010 stammten sogar 92% der Isolate aus der stationären Versorgung. Für die Datenbank kamen die meisten Einsendungen von MRSA-Isolaten der letzten Jahre aus den Abteilungen der Inneren Medizin, Intensivstationen sowie aus der Chirurgie (Robert-Koch-

Institut, 2011) Insbesondere im intensiv-medizinischen Bereich ist die MRSA-Prävalenz im Stationsgruppenvergleich besonders hoch (Kupfer et al., 2010). Dazu können wir mit unseren Daten keine direkte Aussage treffen, da wir nur MRSA-positive Patienten untersucht haben. Es fällt aber auf, dass trotz des kleineren Patientenguts auf Intensivstationen im Vergleich zu allen anderen Stationen, diese immerhin 20% unserer stationären Patienten ausmachten.

4.2.3 MRSA UND ASSOZIATION MIT INFEKTIONEN

Die häufigsten Infektionen durch *S. aureus* sind Haut- und Weichgewebeeinfektionen (inklusive Wundinfektionen), Pneumonien, Meningitis, Endokarditis und Osteomyelitis. (DeLeo et al., 2010). Etwas über die Hälfte unserer Proben wurde aus symptomatischen Infektionen isoliert, hiervon stammte die deutliche Mehrheit (63%) von Haut- und Weichgewebeeinfektionen (inklusive postoperativer Wundinfektion und Abszesse), gefolgt von Pneumonien (13%), Sepsis (8%), Harnwegsinfektionen (7%) und fremdkörperassoziierten Infektionen (6%). Auch für die Datenbank des NRZ wurden 2010 die meisten MRSA-Isolate in Wundinfektionen (18 %) gefunden, gefolgt von Harnwegsinfektionen (6 %), Beatmungspneumonien (6 %) und Sepsis (5,6 %; Datenbank NRZ für Staphylokokken, 2010, Robert-Koch-Institut, 2011). Dieser im Vergleich zu unseren Ergebnissen niedrigere Anteil der Wundinfektionen ist unter anderem damit zu erklären, dass das RKI Abszesse, Dekubitus, Furunkel, Gangrän und Ulzera, die wir unter dem Oberbegriff Haut-, Weichgewebe- und Wundinfektionen zusammengefasst haben, als einzelnstehende Entitäten gewählt hat.

4.2.4 ANTIBIOTIKATHERAPIEN VOR MRSA-NACHWEIS

Methicillin-resistente Staphylokokken sind oft auch resistent gegen weitere Antibiotika (zum Beispiel Aminoglykoside und Fluorchinolone). Zudem begünstigt der häufige Gebrauch von Antibiotika die Ausbreitung von MRSA und die Entstehung neuer Resistenzen. Insbesondere Fluorchinolone (vor allem Ciprofloxacin), Cephalosporine, Makrolide und Amoxicillin/Clavulansäure stehen im Verdacht, das Risiko von Besiedlungen und Infektionen mit MRSA zu erhöhen (Aldeyab et al., 2008; Lowy, 2003; Monnet et al., 2004; Weber et al., 2003). Interessanterweise waren drei dieser vier Antibiotika-Gruppen bei unseren Patienten die drei am häufigsten vor MRSA-Nachweis eingenommenen Antibiotika: Penicilline mit Penicillinase-Hemmern (inklusive Amoxicillin/Clavulansäure; 16%), Fluorchinolone (15%) und Cephalosporine (14%; siehe Kapitel 3.1.7; Abbildung 7). In der Gesamtbevölkerung sind ebenfalls Penicilline die am häufigsten verschriebenen Antibiotika. An zweiter Stelle stehen jedoch

Tetrazykline, Fluorchinolone werden als dritthäufigstes gegeben (Günther & Kern, 2003).

4.3 MOLEKULARE ERGEBNISSE

4.3.1 MEC-ERGEBNISSE

Die meisten MRSA-Isolate verfügten über das klassische *mecA*-Gen, ein Isolat (0,06%) hatte das *mecA* Homolog *mecA*_{LGA251} (*mecC*; García-Álvarez et al., 2011; Kriegeskorte et al., 2012; Laurent et al., 2012; Shore et al., 2011; siehe Kapitel 1.3.1 und 3.2). Es wurde von einer 88-jährigen stationären Patientin mit Haustierkontakt (Katze) im Zentrum Stuttgart isoliert. In anderen Studien wurde *mecA*_{LGA251} (*mecC*) ebenfalls bei Patienten mit Tierkontakt gefunden, dabei handelte es sich meist um Kontakt zu Milchkühen (García-Álvarez et al., 2011; Sabat et al., 2012). In Norwegen wurde jedoch erstmals auch die Übertragung eines *mecC*-positiven MRSA-Isolates (*spa*-Typ t6902) von einer Hauskatze auf ihren Besitzer beschrieben (Medhus et al., 2013).

In anderen retrospektiven Untersuchungen der deutschen MRSA-Population kamen *mecA*_{LGA251} (*mecC*)-positive MRSA-Isolate ähnlich selten wie in unserer Studie vor. Das RKI hat von 2006 bis Juni 2011 elf Isolate unter 12.691 (0,0008%) Einsendungen veröffentlicht (Cuny & Witte, 2011). In Dänemark scheint der Anteil von *mecA*_{LGA251} (*mecC*) bei MRSA-Isolaten seit 2008 jedoch leicht zuzunehmen: von 0,12% in 2008 auf 0,67% in 2010 (García-Álvarez et al., 2011).

Unser Isolat hatte den *spa*-Typ t843, welcher auch der häufigste *spa*-Typ von *mecA*_{LGA251} (*mecC*)-positiven Isolaten von Kühen und Menschen in Großbritannien, Dänemark und im deutschen Teil der EUREGIO Twente/Münsterland war (García-Álvarez et al., 2011; Kriegeskorte et al., 2012).

4.3.2 ERGEBNISSE DER SPA-TYPISIERUNG

Unsere 1603 Isolate ordneten wir 13 *spa*-klonalen Komplexen nach BURP-Analyse (siehe Kapitel 3.2.1, Abbildung 8 bis 13) und 236 verschiedenen *spa*-Typen zu. In der ersten Sammlungsperiode 2004/2005 waren 135 *spa*-Typen in 1753 Isolaten gefunden worden (Schaumburg et al., 2012). Diese Zunahme von *spa*-Typen zeigt die hohe Variabilität und Zunahme der Diversität der Region X des MRSA-*spa*-Gens, wie auch schon anderswo beobachtet (Boye & Westh, 2011; Grundmann et al., 2010). Unsere häufigsten *spa*-Typen waren t003 (40%), t032 (15,5%), t008 (4,5%), t002 (3,2%), t034 (2,6%), t011 (2,4%) und t045 (1,8%). Diese machten 70% der Isolate aus (siehe Kapitel 3.2.1; Abbildungen 8 bis 13). Weltweit sind die häufigsten *spa*-Typen, abgesehen

von dem bei uns sehr häufigen Typ t003, ähnlich verteilt: t032 (10,5%), t003 (10,1%), t002 (6,4%), t008 (6,1%), t011 (3,3%; RidomSpaServer), wobei es regionale Unterschiede gibt. Grundmann et al. haben für die Periode 2006 - 2007 die häufigsten *spa*-Typen von MRSA-Isolaten aus invasiven Infektionen in Europa bestimmt. In dieser Untersuchung war t032 (14,5%) der häufigste Typ, gefolgt von t008 (12,4%), t041(7,4%), t003 (7,3%) und t002 (6,4%; Grundmann et al., 2010). Obwohl diese Isolate ausschließlich aus Infektionen stammten, ist die Verteilung ihrer *spa*-Typen der unserer Isolate sehr ähnlich. Tatsächlich konnten wir bei unseren Isolaten nur für t008 (häufiger bei Infektionen) und t011 und t034 (seltener bei Infektionen) einen Unterschied bei symptomatischen und asymptomatischen MRSA-Trägern feststellen.

4.3.3 REGIONALE HÄUFUNGEN BESTIMMTER SPA-TYPEN

Grundmann kam mit seiner Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass sich die Haupt-MRSA-Linien in Europa nicht gleichmäßig über den Kontinent verteilen, sondern in regionalen Häufungen auftreten. Er führt dies auf eine Verbreitung von MRSA über Gesundheits- und Pflegenetzwerke zurück (Grundmann et al., 2010). Die meisten der Haupt-MRSA-Klone in Deutschland, welche traditionell nach der Region benannt wurden, in der sie das erste Mal aufgetreten sind, gehören zum Rhein-Hessen MRSA (t002/ST5 und t003/ST225), dem Barnim-Stamm (t032/ST22) und dem Norddeutschen MRSA-Klon (t008/ST8). Auch in unserer Studie zeigen sich regionale Häufungen bestimmter MRSA-Stämme. Insgesamt dominierte in Süd- und Westdeutschland der *spa*-Typ t003, im Osten und Norden Deutschlands vor allem Typ t032 und in Mitteldeutschland t034 und t011 (siehe Kapitel 3.2.2; Abbildung 14). Der *spa*-Typ t008 war vor allem in Süddeutschland verbreitet. In Nord- und Süddeutschland wurden vermehrt die bisher seltenen Typen t4217, *spa*-CC 032 (Norddeutschland, n=12) und t4881, *spa*-CC 003 (Südwestdeutschland, n=8) gefunden.

Der Ursprung der MRSA-Isolate mit dem *spa*-Typ t4217/ST22 in Norddeutschland bleibt unklar, da dieser Typ in den publizierten MRSA-Ausbrüchen dieser Gegend nicht vorkommt und sein Auftreten auch nicht mit einer möglichen grenzübergreifenden Übertragung aus Dänemark erklärt werden kann. Ebenso ist auch die Quelle der MRSA-Isolate mit t4881/ST225 in Südwestdeutschland unklar. Eine grenzüberschreitende Ausbreitung dieser Isolate aus Frankreich ist unwahrscheinlich, da die vorwiegenden französischen MRSA-Linien zu t008/ST8, t024/ST8 und t777/ST5 gehören (Grundmann et al., 2010). Der Typ t4881 könnte aus t504 entstanden sein, welcher 2004 der zweithäufigste *spa*-Typ der Gegend war. Die Entstehung von t4881 (26-17-20-17-13-17-17-16) aus MRSA t504 (26-17-20-17-12) ist denkbar, da die Typen ähnli-

che „repeat patterns“ haben (Boye & Westh, 2011; Deurenberg et al., 2009; Schaumburg et al., 2012).

4.4 TOXINGENPROFIL DER MRSA-STÄMME

Um unsere Isolate hinsichtlich ihrer Virulenzfaktoren zu untersuchen, haben wir die entsprechenden Gene, nicht aber die tatsächliche Toxinproduktion bestimmt. Alle Isolate trugen das Gen für Gamma-Hämolyysin - 1509 Isolate (94,1%) mindestens ein weiteres Gen für ein Exotoxin. Im Mittel hatte jedes Isolat vier Virulenzfaktoren (siehe Kapitel 3.3.1; Tabelle 10). Auch in anderen Studien trugen alle MRSA-Isolate ein oder mehr Virulenzfaktoren, wobei Hämolysingene ebenfalls am Häufigsten vorkamen (Argudín et al., 2009; Hu et al., 2011; Menegotto et al., 2012; Yu et al., 2012).

4.4.1 ENTEROTOXINGENE

Von unseren Isolaten kodierten 93% Gene für mindestens eines der Enterotoxine SEA bis SEH. Am meisten wurde *sei* detektiert (85,2% aller Isolate), 85% der Isolate kodierten *seg*. Ebenfalls häufig waren *sed* (49,9%) und *sej* (47,5%), *see* wurde bei keinem der Isolate nachgewiesen (siehe Kapitel 3.3.1; Tabelle 10). Auch in anderen Studien zu Virulenzfaktoren bei MRSA trugen 80 - 100% der Isolate Enterotoxingene. Dabei waren *seg/sei* (70,3 - 86,3% bei Lattar et al., 2012, Menegotto et al., 2012, Yu et al., 2012) und *sed/sej* (40,5% bei Yu et al., 2012) ebenfalls am häufigsten.

Das Gen *see* wurde anderswo gleichermaßen selten nachgewiesen (keines der Isolate bei Argudín et al., 2009; Jiménez et al., 2011; Menegotto et al., 2012 und Yu et al., 2012).

Von unseren Isolaten waren 99,8% der Isolate, welche *seg* kodierten, auch positiv für *sei*. Studien haben gezeigt, dass diese beiden Gene auf einem gemeinsamen Operon, dem „enterotoxin gene cluster“ (*egc*), liegen und deswegen in der Regel zusammen auftreten (Becker et al., 2003; Blaiotta et al., 2006). Dass *seg* und *sei* bei unseren Isolaten in einigen Fällen getrennt detektiert wurden, könnte an der hohen Mutationsrate im *egc* liegen, die gelegentlich dazu führt, dass nicht alle *egc*-assoziierten Gene kodiert werden. Zudem ist es möglich, dass aufgrund mangelnder Sensitivität der Multiplex-PCR nicht alle Gene detektiert wurden (Blaiotta et al., 2006).

Auch *sed* und *sej* treten für gewöhnlich in Kombination auf, da die Gene von demselben Plasmid kodiert werden und im Genom dicht beieinander liegen (Becker et al., 2003; Blaiotta et al., 2006; Zhang et al., 1998). Bei uns wurde *sej* zwar in den meisten Fällen zusammen mit *sed* detektiert (in 97,6%), jedoch nicht ausschließlich: 2,3%

(n=18) der Gene für *sej* traten ohne *sed* auf. Auch hierfür kann die Ursache in Mutationen im Operon oder in der mangelnden Sensitivität der Detektion mittels PCR liegen (Blaiotta et al., 2006, Guinane et al., 2011).

4.4.2 ENTEROTOXINGENE UND ASSOZIATION MIT INFEKTION

In unserer Studie bestand kein Zusammenhang zwischen der Anzahl detektierter Virulenzfaktoren pro Isolat und der Häufigkeit ausgelöster Infektionen.

Für einzelne Enterotoxingene konnten Zusammenhänge jedoch gefunden werden.

So konnten wir die Vermutung von Nhan et al., nach welcher *sec* häufiger in infiziertem als in kolonisiertem Gewebe gefunden wird (Nhan et al., 2011), bestätigen, da auch bei uns *sec*-positive Isolate signifikant häufiger aus Infektionsmaterial gewonnen wurden als von asymptomatischen Besiedlungen ($p < 0,001$; siehe Kapitel 0). Unsere *sec*-positiven Isolate verfügten sonst nicht gehäuft über weitere Virulenzfaktoren und waren insbesondere selten PVL-positiv. Dies spricht dafür, dass *sec* für sich allein bereits einen bedeutenden Virulenzfaktor darstellt.

Für weitere Enterotoxingene konnte keine signifikante Verbindung mit Infektionen gefunden werden. Becker et al. stellten einen Zusammenhang zwischen *sed/sej* und Isolaten aus Blutstrominfektionen fest (Becker et al., 2003). In unserer Studie kam *sed/sej* ebenso häufig bei Infektionen wie im Gesamtkollektiv vor. Auch bei Isolaten aus „nicht fremdkörperassoziierter Sepsis“ fanden wir *sed/sej* nicht häufiger als im Gesamtkollektiv.

4.4.3 WEITERE TOXINGENE UND ASSOZIATION MIT INFEKTION

In unserem Kollektiv waren 0,9% der Isolate (n=14) positiv für *tst* (siehe Kapitel 3.3.1; Tabelle 10). In vergleichbaren Studien wurde *tst* ebenfalls selten detektiert (0 - 10% bei Jiménez et al., 2011; Menegotto et al., 2012; Yu et al., 2012). In einer Studie von Becker et al. 2003 zu Enterotoxingenprofilen von *S.aureus*-Stämmen war *tst* hingegen das häufigste klassische Enterotoxigen (20,3%). In der Studie wurden jedoch nicht zwischen Methicillin-sensiblen und Methicillin-resistenten *S.aureus*-Stämmen unterschieden, weswegen möglicherweise andere klonale Linien vorlagen als in unserer Studie. Tatsächlich wird vermutet, dass der Erwerb von Genen, die die Resistenz gegen Antibiotika vermitteln, die Ausstattung mit Virulenzgenen von *S.aureus* verändert und möglicherweise mit einer verminderten Kodierung von Virulenzgenen einhergeht (Jiménez et al., 2011, Collins et al., 2010).

Wie auch in anderen Studien (0 - 3% bei Jiménez et al., 2011; Menegotto et al., 2012) wurden die Exfoliativtoxigene *eta* (n=0), *etb* (n=0) und *etd* (0,5%; n=8) von unseren

Isolaten selten kodiert. Interessanterweise trugen sieben der acht Isolate mit dem *etd*-Gen den Zelldifferenzierungsfaktor *edin-B*. Es ist bekannt, dass diese beiden Gene auf dem Chromosom innerhalb derselben Pathogenitätsinsel liegen und somit meist gemeinsam detektiert werden (Yamaguchi et al., 2002).

Der epidermale Zelldifferenzierungsinhibitor EDIN-B hemmt ein GTP-Bindeprotein des eukaryontischen Aktinskeletts und kann so wichtige Funktionen der Wirtszellen blockieren und Infektionen mit *S. aureus* begünstigen (Yamaguchi et al., 2002; Yamasaki et al., 2006).

Das Toxin ETD ist den Exfoliativtoxinen ETA und ETB strukturell sehr ähnlich und löst, in die Haut von Mäusen injiziert, eine ähnliche Blasenbildung der Epidermis aus. Trotzdem wird ETD sehr viel seltener bei Patienten mit bullöser Impetigo oder „staphylococcal scalded skin syndrome“ (SSSS) gefunden, sondern ist meist verantwortlich für Haut- und Weichgewebeeinfektionen und Abszesse (Yamasaki et al., 2006). Yamaguchi et al. vermuteten, dass ETD eine entscheidende Rolle bei einem breiteren Spektrum von Infektionen einnimmt, als bisher angenommen. Das Toxin könnte möglicherweise die Ausbreitung von *S. aureus* durch die Zerstörung epithelialer Barrieren erleichtern und den Weg für tieferliegende Gewebeeinfektionen freimachen (Yamaguchi et al., 2002).

Tatsächlich war keines unserer MRSA-Isolate mit einem SSSS assoziiert. Stattdessen waren Isolate, die *etd/edin-B* trugen, signifikant mit Abszessen assoziiert (siehe Kapitel 0). Sie hatten die *spa*-Typen t044 und t203 und waren alle positiv für PVL (CA-MRSA). Dies spricht für die Theorie von Yamasaki et al., dass neben PVL möglicherweise auch *etd* und *edin-B* für die hohe Virulenz von CA-MRSA mitverantwortlich sind (Yamasaki et al., 2006).

4.4.4 EXOTOXINGENE IM ZUSAMMENHANG MIT SPA-TYPEN UND AGR-SUBTYPEN

In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass Exotoxinprofile stark mit bestimmten *S. aureus*-Klonen assoziiert sind (Argudín et al., 2009; Holtfreter et al., 2007; Lattar et al., 2012; Monecke et al., 2011; van Trijp et al., 2010). Es wurde jedoch bisher wenig auf die Korrelation mit bestimmten *spa*-Typen eingegangen. In unserer Studie mit 1603 *spa*-typisierten MRSA-Isolaten wird deutlich, dass das Exotoxinprofil einzelner Isolate stark mit ihrem *spa*-Typ und *spa*-CC korreliert (siehe Kapitel 0). Der *spa*-Komplex CC 003 (t002, t003, t014, t045) war überwiegend mit *sed/sei* und *seg/sej* assoziiert. Isolate, die zum *spa*-CC 008 (t008) gehörten, waren vor allem positiv für *sed/sei* und *sea*, Isolate vom *spa*-CC 032 (t022, t032, t8374) waren häufig positiv für *seg/sei* und *sec*, *seh* kam ausschließlich bei t127 (*spa*-CC 127) vor (siehe Kapitel 3.4.1; Abbildung 17).

Die insgesamt 14 Isolate mit *tst* gehörten zu neun verschiedenen *spa*-Typen aus drei verschiedenen *spa*-CCs, ein signifikanter Zusammenhang ergab sich für *spa*-CC 012 (*spa*-Typen t012, t018, t021, t122) und *tst* (siehe Kapitel 3.4.3; Abbildung 19). Isolate mit *spa*-CC 011 (t011 und t034) verfügten über auffällig wenige Virulenzfaktoren.

In früheren Studien wurde eine hohe Kongruenz zwischen *spa*-Typen und *agr*-Subtypen beschrieben (Shopsin et al., 2003). Das *agr*-Operon spielt eine wichtige Rolle in der Produktion von multiplen Virulenzfaktoren und ist ebenfalls hilfreich bei der Unterscheidung genetischer Hintergründe von MRSA-Isolaten (Iwatsuki et al., 2006; Montgomery et al., 2010).

Der häufigste *agr*-Subtyp in unserer Studie war *agrII* mit 54,3% der Isolate, gefolgt von *agrI* (43,4%) und *agrIII* (2,2%). Der Subtyp *agrIV* wurde nicht detektiert (siehe Kapitel 3.5). In den Studien von Collery et al. und Shopsin et al. wurde *agrI* am häufigsten gefunden, gefolgt von *agrIII*, anders als bei uns schien *agrII* seltener vorzukommen als *agrI* und *III*. Der *agr*-Subtyp IV ist auch in der Literatur selten zu finden (Collery et al., 2008; Shopsin et al., 2003).

Auch in unseren Ergebnissen zeigte sich die deutliche Zugehörigkeit bestimmter *spa*-Typen zu *agr*-Subtypen (siehe Kapitel 3.5.1; Abbildung 20). Am deutlichsten war der Zusammenhang für die zehn häufigsten *spa*-Typen, die alle zu *agrI* (t032, t008, t034, t011, t8374 und 89% von t022) oder *agrII* (t003, t045, t014, t002) gehörten.

Trotz der Zusammengehörigkeit von *agr*-Subtypen und *spa*-Typen ist die Assoziation zwischen *agr*-Subtypen und Toxingenen nicht so offensichtlich. Collery et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen *agr*-Subtypen und SE-Gruppen feststellen. Jarraud et al. beobachteten hingegen, dass SE-Gene hauptsächlich mit *agr*-Subtypen I und II auftreten. Bei beiden gehörten alle *tst*-positiven Isolate zu *agrIII* (Collery et al., 2008; Jarraud et al., 2002). Bekannt ist allerdings, dass Isolate, die PVL und *etd/edin-B* kodieren, ebenfalls zu *agrIII* gehören (Yamasaki et al., 2006).

Bei uns fielen einige Zusammenhänge zwischen *agr*-Subtyp und Toxingengenprofil der Stämme auf (siehe Kapitel 3.5.2; Abbildung 21). Die Gene *seg/sei* kamen, wie anderswo beschrieben, vor allem bei *agr*-Subtyp I und II vor, *sec* war hingegen nur mit *agrI* assoziiert. Der *agr*-Subtyp II korrelierte vor allem mit *sed/sej*. Alle Gene für SEH wurden von Isolaten mit *agr*-Subtyp III kodiert. Isolate mit den Genen für TSST, ETD und EDIN-B waren auch bei uns deutlich mit *agr*-Subtyp III assoziiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Ergebnisse die Erkenntnis stützen, dass verwandte MRSA-Isolate über gemeinsame genetische Ursprünge mit ähnlichen Mustern von *agr*-Subtypen, *spa*-Typen und Exotoxingenen verfügen.

4.5 CA-MRSA

In unserer Studie waren 2,7% (n=44) der Isolate PVL-positiv (siehe Kapitel 3.6; Tabelle 10). Grundmann et al. haben ein Anteil von PVL-positiven MRSA-Isolaten von 2,1% an allen Isolaten in Europa 2010 beschrieben (Grundmann et al., 2010) und auch andere Arbeitsgruppen haben ähnliche Prävalenzen gefunden (2,4% und 3,1% bei Blomfeldt et al., 2012 und Köck et al., 2011).

Höhere Raten an PVL-positiven Isolaten fielen bei unseren Einsendungen aus den bevölkerungsdichten Regionen Hamburg (6,1%; n=6/99) und Frankfurt am Main (8,8%; n=4/45) auf. Beide Städte sind internationale Reiseknotenpunkte. In verschiedenen Studien ist gezeigt worden, dass sich PVL-positive MRSA und MSSA durch internationale Reisen ihrer Träger ausbreiten (Stenhem et al., 2010; Zanger et al., 2012).

PVL ist ein klassischer Marker für CA-MRSA (David & Daum, 2010; Grundmann et al., 2010; Köck et al., 2011; Robert-Koch-Institut, 2011; Schaumburg et al., 2012).

Tatsächlich kamen die Risikofaktoren „Krankenhausaufenthalt in den letzten 12 Monaten“ und „Mehr als 48 Std. hospitalisiert vor Nachweis des 1. MRSA-Isolats“ bei Patienten mit PVL-positiven MRSA selten vor (siehe Kapitel 3.6; Tabelle 11) und die Gesamtanzahl von Risikofaktoren für den nosokomialen Erwerb von MRSA war bei PVL-positiven Isolaten niedriger als bei PVL-negativen (siehe Kapitel 3.6)

CA-MRSA scheinen virulenter zu sein als andere MRSA-Stämme (Boyle-Vavra & Daum, 2007; Schaumburg et al., 2012; Valsesia et al., 2010). Auch bei uns wurden PVL-positive MRSA vor allem aus Infektionen isoliert, 76% der PVL-positiven Isolate waren mit Infektionen assoziiert. Am häufigsten waren dies Haus- und Weichgewebeeinfektionen, die im ganzen Kollektiv die häufigsten Infektionen waren. Auffallend hoch war die Prävalenz des PVL-Gens bei Isolaten aus Abszessen, hier war ein Drittel der Isolate PVL-positiv. Die Assoziation von PVL-positiven MRSA-Stämmen mit Weichgewebeeinfektionen und Abszessen ist bereits beschrieben (David & Daum, 2010; Dufour et al., 2002; Robert-Koch-Institut, 2011; Valsesia et al., 2010). Auch bei den im Jahr 2010 ins NRZ gesandten CA-MRSA-Isolaten waren Haut- und Weichgewebeeinfektionen einschließlich Abszesse die häufigsten assoziierten Infektionen (Robert-Koch-Institut, 2011).

In Afrika, wo insgesamt der Anteil PVL-positiver Isolate hoch zu sein scheint (42,7% in Nigeria, 55% in Gabon, 100% der ST152 Isolate in Mali bei Okon et al., 2009; Ruimy et al., 2008; Schaumburg et al., 2011) wurde ebenfalls ein enger Zusammenhang mit Abszessen gefunden. In einer Studie über symptomatische und asymptomatische *S. aureus*-Träger aus Gabun waren alle *S. aureus*-Isolate aus Abszessen PVL-positiv

(Schaumburg et al., 2011). Bei diesen Isolaten handelte es sich allerdings hauptsächlich um Methicillin-sensible *S. aureus*-Stämme (MSSA; Schaumburg et al., 2011). Jedoch haben Populationsstudien in der letzten Zeit Hinweise dafür erbracht, dass PVL-positive MRSA und MSSA ähnliche molekulare Profile aufweisen und in einer dynamischen Wechselbeziehung zueinander stehen (Rasigade et al., 2010), weswegen diese Daten mit unseren vergleichbar sind.

4.5.1 MOLEKULARE EIGENSCHAFTEN VON CA-MRSA

Bei uns zählten 31,8% der CA-MRSA Isolate zu den klassischen CA-MRSA-*spa*-Typen (t044/ST80 und t008/ST8). Der häufigste *spa*-Typ war t008 (USA300; n=10; siehe Kapitel 3.6). Die Prävalenz des PVL-positiven USA300-Klons scheint in Deutschland zuzunehmen. In einer Vergleichsstudie aus 2005 war t044 (USA400) noch der häufigste deutsche CA-MRSA *spa*-Typ (Schaumburg et al., 2012). Auch in den Daten des NRZ für Staphylokokken ist eine Zunahme des USA300-Klons in Deutschland in den letzten Jahren zu sehen (Robert-Koch-Institut, 2011). Dieser Trend wird weltweit beobachtet, so scheint sich der für seine hohe Virulenz bekannte USA300-Stamm mehr und mehr auszubreiten und andere CA-MRSA-Stämme zu verdrängen (Jiménez et al., 2011; Montgomery et al., 2010; Rasigade et al., 2010)

Die MRSA-Isolate, welche PVL kodierten, verfügten bei uns über weniger weitere Virulenzfaktoren als die PVL-negativen Isolate (siehe Kapitel 3.6; Abbildung 23). Dies entspricht Ergebnissen anderer Studien, in denen PVL-positive MRSA-Isolate außer *etd/edin-B* ebenfalls kaum weitere Exotoxingene besaßen (Dufour et al., 2002; Robert et al., 2011; Yamasaki et al., 2006).

4.6 HA-MRSA

Im Gesamtkollektiv gehörten 55,4% der Isolate zu den klassischen HA-MRSA-Linien (t003/ST225 und t032/ST22). Sie wurden gleich oft von symptomatischen wie asymptomatischen Trägern isoliert und waren meist mit Haut- und Weichgewebeeinfektionen assoziiert.

Insgesamt wiesen 699 Patienten der Studie (43,6%) mindestens einen der Risikofaktoren für HA-MRSA auf (siehe Kapitel 3.1.6; Tabelle 5). Der häufigste Risikofaktor war „Krankenhausaufenthalt in den letzten 12 Monaten“ bei 82,8% der Patienten. Dies korreliert mit der jährlich steigenden Anzahl von Patientenfallzahlen in deutschen Krankenhäusern (22 057 Patienten pro 100 000 Einwohner 2010; Statistisches Bundesamt, 2011).

Die Patienten mit HA-MRSA hatten insgesamt mehr Risikofaktoren für den nosokomialen Erwerb von MRSA als Patienten mit CA-MRSA (siehe Kapitel 3.7, Abbildung 24). Demnach spiegelt sich die erhöhte Wahrscheinlichkeit einer HA-MRSA-Infektion bedingt durch die klassischen Risikofaktoren in unseren Ergebnissen wider.

4.7 LA-MRSA

4.7.1 GEOGRAPHISCHE VERTEILUNG

Die *spa*-Typen, die mit *spa*-CC 011 (t011, t034 und damit verwandten *spa*-Typen; siehe Kapitel 3.8, Abbildung 25) assoziiert sind, weisen auf LA-MRSA mit dem MLST klonalen Komplex 398 hin. Anfangs wurden LA-MRSA nur bei Zuchtschweinen gefunden, mittlerweile wird von ihrer Ausbreitung auf andere Tiere (Rinder, Hühner, Pferde und Haustiere), sowie auf exponierte Personen wie Bauern, Viehzüchter und Tierärzte berichtet (Cuny et al., 2013; Johnson, 2011; Köck et al., 2013; Wulf et al., 2008).

In dieser Studie zählten 5,4% aller Isolate zu CC398. Es gab jedoch deutliche regionale Unterschiede in der Häufigkeit von LA-MRSA. Während LA-MRSA im Großteil Deutschlands 1,9% der Isolate ausmachten, lag der Anteil in Teilen Nordrhein-Westfalens und Niedersachsens bei 40,1% (Zentren Münster, Bad Oeynhausen und Hannover, wobei Hannover mit 82% der MRSA-Isolate den höchsten Anteil hatte; siehe Kapitel 3.8; Abbildung 26). In dieser Region, insbesondere im Münsterland und in Niedersachsen, gibt es vergleichsweise viele Viehzuchtbetriebe (Köck et al., 2013). Die sehr hohe Prävalenz von LA-MRSA in Niedersachsen (82%) ist jedoch mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht repräsentativ, da aus diesem Bundesland nur ein Labor an unserer Studie teilnahm.

Insgesamt entsprechen unsere Ergebnisse aber dem Vorkommen von LA-MRSA in anderen Untersuchungen: Während in ganz Deutschland der Anteil von LA-MRSA an den MRSA-Isolaten relativ gering ist (2% in Krankenhäusern bei Spohr et al., 2011 und 3,2% aller Isolate des NRZ für Staphylokokken 2010 (Robert-Koch-Institut, 2011)), ist die Prävalenz von LA-MRSA in Regionen hoher Viehzuchtdichte deutlich höher: Aus deutschen Regionen mit hoher Schweinedichte sind Anteile von bis zu 20% LA-MRSA beschrieben worden (Köck et al., 2011) und in einer Studie in der Grenzregion Münsterland/Osnabrückerland/Twente (EUREGIO) gehörten von 2008 bis 2012 18,6% aller Isolate zu CC398, wobei in dieser Zeit eine deutliche Zunahme der MRSA-Isolate zu verzeichnen war (29% in 2012; Köck et al., 2013). Tatsächlich wurde in den Niederlan-

den kürzlich das Leben in viehzuchtdichten Gegenden als unabhängiger Risikofaktor für die Besiedlung mit LA-MRSA festgestellt (Feingold et al., 2012).

4.7.2 EPIDEMIOLOGISCHE UND KLINISCHE DATEN

Interessanterweise war in der Studie von Köck et al. in der EUREGIO ein signifikanter Anteil von CC398 an klinischen MRSA-Isolaten aufgefallen (8% der Blutkulturen und 14% Sekretproben aus dem Respirationstrakt; Köck et al., 2013).

Bisher war man im Allgemeinen von einer eher niedrigen Virulenz von CC398 MRSA im Vergleich zu anderen MRSA-Stämmen ausgegangen, da sie nur selten aus klinisch symptomatischen Proben isoliert worden waren (1-1,7% der Isolate aus Bakteriämien und Infektionen bei Grundmann et al., 2010 und im NRZ des Robert-Koch-Instituts, 2011). Schwere Infektionen durch LA-MRSA waren nur in Einzelfällen berichtet worden (Graveland et al., 2011). Auch bei uns waren nur 1,6% der mit Infektion assoziierten MRSA-Isolate LA-MRSA. Häufiger kamen MRSA-Isolate bei asymptomatischen Trägern vor, hier waren es im Gesamtkollektiv sogar 16% der Isolate (siehe Kapitel 3.8). Zudem kodierten die LA-MRSA-Stämme im Vergleich zum Gesamtkollektiv weniger Virulenzfaktoren (Mittelwert: 1,2 ($\pm 0,6$); Spannweite: 1 - 4; $p < 0,001$; siehe Kapitel 3.8), 93% kodierten lediglich *hlg* als einziges Virulenzgen (siehe Kapitel 0). Auch in anderen Studien wurde bereits beobachtet, dass LA-MRSA über weniger Virulenzfaktoren verfügen als andere MRSA-Stämme (Köck et al., 2011).

In dieser Studie war LA-MRSA häufiger bei Patienten ohne Risikofaktoren für nosokomial erworbene MRSA und somit öfter ambulant als nosokomial erworben (Kapitel 3.8). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da LA-MRSA in der Regel von Tieren auf Menschen übertragen wird und der Aufenthalt in Krankenhäusern bisher noch nicht als Risikofaktor für eine Besiedlung mit LA-MRSA gilt (Graveland et al., 2011). Allerdings wurden in Hannover, dem Zentrum mit der höchsten LA-MRSA-Prävalenz, keine Angaben zu Risikofaktoren gemacht. Dies wäre interessant gewesen, da insbesondere in Niedersachsen vermehrt auch der Import von LA-MRSA in deutsche Krankenhäuser beschrieben worden ist (Köck et al., 2011, 2013).

Von unseren Patienten mit Nutztierkontakt waren 33% mit LA-MRSA besiedelt (Kapitel 3.8.1). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass „Tierkontakt“ und insbesondere „Kontakt zu Nutztieren“ noch immer den wichtigsten Risikofaktor für eine Besiedlung mit LA-MRSA darstellt.

4.8 EINSCHRÄNKUNGEN DER STUDIE

Für diese Studie wurden möglichst geographisch repräsentativ ausgewählte Zentren mit mikrobiologischer Diagnostik für ambulante und stationäre Patienten in ganz Deutschland dazu aufgefordert, Isolate konsekutiv zu sammeln und einzuschicken (siehe Kapitel 2.1). Eine Einschränkung ist der relativ geringe Anteil von Zentren aus den neuen Bundesländern und Berlin. In den bevölkerungsreichen Gebieten Deutschlands (West- und Süddeutschland) finden sich gehäufte beteiligte Studienzentren. Insbesondere die Analyse von Isolaten aus Berlin hätte noch wichtige Informationen über die Prävalenz PVL-positiver Isolate in deutschen Großstädten einbringen können. Außerdem nahm aus dem Bundesland Niedersachsen, das eine hohe Dichte an Schweinezuchtbetrieben hat, nur ein MRSA-Zentrum teil, weswegen die hohe Prävalenz von LA-MRSA in Niedersachsen nur eingeschränkt repräsentativ für die Region sein dürfte.

Die Detektion verwandter MRSA-Klone und ihrer geographischen Verteilung mittels *spa*-Typisierung könnte zu möglichen Ungenauigkeiten geführt haben. Erstens könnte die relativ kleine Sequenz des *spa*-Gens aus etwa 280 Basenpaaren ein eher schwacher Indikator für das ganze *S. aureus*-Genom sein (Grundmann et al., 2010). Außerdem wäre es denkbar, dass die diskriminatorische Power der *spa*-Typisierung eingeschränkt ist, insbesondere wenn man beachtet, dass über die Hälfte unserer Isolate zu nur zwei *spa*-Typen gehörten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme galten lange als rein nosokomiale Infektionserreger („hospital-acquired“ = HA-MRSA), breiteten sich jedoch in den letzten Jahren auch außerhalb von Gesundheitseinrichtungen („community-associated“ = CA-MRSA) und bei Personen mit Kontakt zur Viehzucht („livestock-associated“ = LA-MRSA) aus. Repräsentativ erhobene Daten zur klonalen Struktur der in Deutschland vorkommenden MRSA-Stämme fehlten bisher. In dieser Studie wurden die aktuelle Epidemiologie, die genetischen Hintergründe, die Ausstattung mit Virulenzfaktoren sowie klinische Daten zu MRSA-Stämmen aus dem Jahr 2010 untersucht und ausgewertet.

An der Studie nahmen 33 mikrobiologische Laboratorien aus ganz Deutschland teil. Jedes Zentrum sammelte konsekutiv bis zu 50 MRSA-Isolate von symptomatischen und asymptomatischen Patienten, versandte diese zur weiteren Charakterisierung an das Studienzentrum Münster und füllten für jedes Isolat einen standardisierten Fragebogen aus. Pro Patient wurde maximal ein Isolat in die Studie eingeschlossen. Die teilnehmenden Labore erhielten Einsendungen aus dem ambulanten und/oder stationären Bereich.

Die Spezieszugehörigkeit sowie die *mecA*- beziehungsweise *mecC*-kodierte Methicillin-Resistenz wurden molekulargenetisch mittels PCR-Verfahren ermittelt. Zusätzlich wurden Virulenzfaktorgene (für pyrogene Superantigene, Exfoliativtoxine, Leukozidine und *agr*-Subtypen) bestimmt. Ein Isolat trug *mecA*_{LGA251} (*mecC*).

Zur Genotypisierung der insgesamt 1603 Isolate wurde die sequenzbasierte *S. aureus* Protein A (*spa*)-Typisierung eingesetzt. Damit konnten 236 *spa*-Typen unterschieden werden. Die häufigsten *spa*-Typen in ganz Deutschland waren t003 (40,0%; n=639) und t032 (15,5%; n=249). In Süd- und Westdeutschland dominierte der *spa*-Typ t003, im Osten und Norden Deutschlands vor allem t032 und in Mitteldeutschland t034 und t011. In Nord- und Süddeutschland wurden vermehrt die bisher seltenen Typen t4217 und t4881 gefunden.

Der Anteil Panton-Valentine-Leukozidin (PVL)-positiver Isolate (CA-MRSA) lag bei 2,7% (n=44). Sie kamen häufiger bei symptomatischen als bei klinisch unauffälligen Trägern vor und waren besonders mit Abszessen assoziiert. Höhere Raten an PVL-positiven Isolaten fielen in Hamburg (6,1%; n=6/99) und Frankfurt am Main (8,8%; n=4/45) auf. Dies lässt sich erklären, da beide Städte als internationale Reiseknoten-

punkte gelten und Auslandsreisen einen wichtigen Risikofaktor für die Ausbreitung von CA-MRSA darstellen.

Mit MLST Typ ST398 assoziierte LA-MRSA-Stämme (*spa*-Typ t011, t034 und verwandte *spa*-Typen) kamen in ganz Deutschland vor. Ihr Anteil war jedoch in Teilen Nordrhein-Westfalens und Niedersachsens (Zentren Münster, Bad-Oeynhausen, Hannover), wo es viele Viehzuchtbetriebe gibt, mit 40,1% (n=59/147) der Isolate deutlich höher als in den restlichen Teilen Deutschlands (1,9%; n=27/1456).

Der am häufigsten detektierte *agr*-Subtyp war *agrII* (54,3%; n=870) gefolgt von *agrI* (43,4%; n=696) und *agrIII* (2,2%; n=35). Der *agr*-Subtyp IV wurde nicht detektiert. Ausnahmslos alle Isolate kodierten das Gen für Gamma-Hämolysin (*hlg*) und 93% (n=1491) mindestens ein Enterotoxigen (*se*). Die Genkombination *seg/sei* wurde von 85% (n=1363) der Isolate kodiert. Am zweithäufigsten war *sed/sej* bei 47% (n=753) der Isolate. Für *sec* (20,1%; n=322) zeigte sich ein Zusammenhang mit Infektionen, *see* wurde bei keinem der Isolate detektiert.

Nur 14 Isolate (0,9%) kodierten das „Toxic Shock Syndrome“-Gen *tst*. Die Exfoliativtoxigene *eta* und *etb* kamen nicht vor, *etd* wurde von acht Isolaten (0,5%) kodiert. Sieben dieser Isolate waren auch positiv für den Zell-Differenzierungsfaktor *edin-B* und PVL.

Neben wenigen dominierenden klonalen MRSA-Linien existiert eine große Vielfalt verschiedener *spa*-Typen. Die klassischen HA-MRSA-Stämme machen weiterhin den Hauptanteil der MRSA-Population in Deutschland aus, jedoch finden sich, insbesondere in Schwerpunktregionen, auch wesentliche Anteile von CA- und LA-MRSA.

6 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Karsten Becker aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster bedanken, der zusammen mit Prof. Dr. med. Christof von Eiff diese Arbeit anregte und ermöglichte. Er gewährleistete eine exzellente Betreuung, ließ dabei Raum für eigene Ideen und erzeugte durch seine ermutigende und interessierte Haltung eine angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt zudem Dr. med. Frieder Schaumburg, der zu jeder Zeit geduldig und zuverlässig alle Fragen beantwortete, immer für ausreichend Labormaterial und Arbeitsplätze sorgte und mir bei jeglichen Problemen und Zweifeln hilfreich zur Seite stand. Außerdem danke ich ihm für die Hilfe bei der Auswertung der *spa*-Typisierung, die Erstellung des Fragebogens, die Hilfe bei der Datenbank und nicht zuletzt für seine schnellen und sorgfältigen Korrekturen und Denkanstöße während der schriftlichen Arbeit.

Weiter möchte ich mich bei Martina Schulte und Anja Hassing (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Münster) bedanken, die die Einsendungen aus den Laboren verwalteten, bei der Extraktion der DNA für die *spa*-Typisierung der MRSA-Isolate halfen und die Typisierung der Virulenzfaktoren durchführten.

Dem Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster und insbesondere PD. Dr. med. Alexander Mellmann, Dr. med. Robin Köck, Ursula Keckevoet und Isabell Ramminger danke ich für die Sequenzierung der *spa*-Sequenzen auf der Sequenzierplattform „PBA-Zoo Re-Sequencing Center“ (<http://www.pba-zoo.de>).

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern, Doktoranden, Diplomanden und technischen Assistenten der Medizinischen Mikrobiologie Münster für ihre kollegiale Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ich danke den teilnehmenden mikrobiologischen Laboren unter Leitung der folgenden Personen (in alphabetischer Reihenfolge) für die Bereitstellung der MRSA-Isolate: Albert, Erlangen; Ansgar-Chorus, Bochum; Becker, Münster; Beyreiß, Cottbus; Bierbaum, Bonn; Bührlen, Stuttgart; Claussen, Hannover; Diaz, Köln; Eigner, Heidelberg; Freytag, Bad-Oeynhausen; Jansen, Mainz; Jonas, Freiburg; Kaase, Bochum; Kalka-Moll, Mönchengladbach; Kaufers, Hamburg; Kresken, Rheinbach; Lommel, Ludwigshafen; Müller, Würzburg; Pfister, Jena; Koblenz, Rissland; Rosenthal, Wiesbaden; Schaefer/Wichelhaus, Frankfurt; Schmidt-Wieland, Ravensburg; Schubert, Kiel; Seifert, Köln; Simon, München; Suerbaum, Hannover; Trautmann, Stuttgart; van-der-Linden,

Aachen; von-Wulffen, Hamburg; von-Müller, Homburg; Würstl, München; Zöllner, Moers.

Die Arbeit wurde von der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, Arbeitsgruppe Staphylokokken-Infektionen und von der MedVet-Staph Projekts des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unterstützt.

7 LEBENSLAUF

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>agr</i>	accessory gene regulator
AIP	autoinduzierendes Peptid
bp	base pair (Basenpaar)
BURP	based upon repeat pattern
°C	Grad Celsius
CA-MRSA	community-acquired MRSA
CC	clonal complex
<i>ccr</i>	cassette chromosome recombinase
CDC	Center for Disease Control and Prevention
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDIN	epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN-A, -B, -D)
ET	Exfoliativtoxin (ETA, ETB, ETC)
<i>et</i>	Exfoliativtoxigen
et al.	et alii
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung in einer Zentrifuge
HLG	Gamma-Hämolysin
<i>hlg</i>	Gamma-Hämolysin-Gen
HA-MRSA	hospital-acquired MRSA
kb	Kilobase
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
lukF-PV	F Komponente von Panton-Valentine-Leukozidin
lukS-PV	S Komponente von Panton-Valentine-Leukozidin
<i>mec</i>	methicillin resistance gene (A, C, LGA251)

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLST	multilocus sequence typing
MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>S. aureus</i>
μl	Mikroliter
<i>nuc</i>	Gen für eine <i>S. aureus</i> spezifische, thermostabile Nuklease
OR	odds ratio
pAVK	periphere Verschlusskrankheit
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
RKI	Robert-Koch-Institut
Ridom	ribosomal differentiation of microorganisms
SCC	staphylococcal cassette chromosome
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SE	Enterotoxin (SEA-SEQ)
<i>se</i>	Enterotoxigen (<i>sea-seq</i>)
SHT	Schädelhirntrauma
<i>smal</i>	PFGE-Restriktionsenzym für <i>S. aureus</i>
<i>spa</i>	<i>S. aureus</i> Protein A
SSSS	staphylococcal scaled skin syndrome
ST	Sequenztyp für MLST
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Taq-Polymerase	Thermus aquaticus DNA-Polymerase
TSS	toxic shock syndrome (engl.)
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ μ l	units pro Mikroliter
ZVK	zentraler Venenkatheter

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Fragebogen zur Erhebung klinischer und epidemiologischer Daten, Seite 1	15
Abbildung 2: Fragebogen zur Erhebung klinischer und epidemiologischer Daten, Seite 2 und 3	16
Abbildung 3: Materialverteilung der eingeschickten Isolate	23
Abbildung 4: Verteilung der Infektionen mit MRSA-Nachweis	24
Abbildung 5: Chronische Grunderkrankungen der Patienten.....	25
Abbildung 6: Anzahl der Risikofaktoren für eine MRSA-Besiedlung	27
Abbildung 7: Antibiotikapräparate vor MRSA-Nachweis	28
Abbildung 8: verwandte <i>spa</i> -Typen nach BURP-Analyse für spa-CC 003.....	31
Abbildung 9: verwandte <i>spa</i> -Typen nach BURP-Analyse für spa-CC 032.....	32
Abbildung 10: verwandte <i>spa</i> -Typen nach BURP-Analyse für spa-CC 008.....	33
Abbildung 11: verwandte <i>spa</i> -Typen nach BURP-Analyse für spa-CC 011 und spa-CC 012	33
Abbildung 12: verwandte <i>spa</i> -Typen nach BURP-Analyse für spa-CC 655.....	34
Abbildung 13: verwandte <i>spa</i> -Typen nach BURP-Analyse der spa-CCs 004, spa-CC 127, spa-CC 044 und spa-CC 692/690	34
Abbildung 14: Übersicht über die beiden häufigsten <i>spa</i> -Typen nach Bundesländern.	38
Abbildung 15: Verteilung der häufigsten <i>spa</i> -Typen bei ambulant und nosokomial erworbenen MRSA	39
Abbildung 16: Verteilung der Anzahl vorhandener Virulenzfaktoren im Gesamtkollektiv	41
Abbildung 17: Anteil der Enterotoxingene bei den Isolaten mit den zehn häufigsten <i>spa</i> -Typen	44
Abbildung 18: Assoziation von <i>spa</i> -Typen und <i>etd/edin-B</i>	44
Abbildung 19: Assoziation von <i>spa</i> -Typen und <i>tst</i> (n=14).....	45
Abbildung 20: Anteil der <i>agr</i> -Subtypen an den Isolaten mit den zehn häufigsten <i>spa</i> -Typen.	46
Abbildung 21: Assoziation der <i>S. aureus</i> Exotoxingene mit den <i>agr</i> -Subtypen I-III	47
Abbildung 22: <i>spa</i> -klonale Komplexe (<i>spa</i> -CCs) nach BURP-Analyse der <i>spa</i> -Typen der PVL-positiven Isolate	48
Abbildung 23: Exotoxingene bei PVL-positiven Isolaten.....	51

Abbildung 24: Box-Whisker-Plot der Anzahl der Risikofaktoren für den nosokomialen Erwerb von MRSA bei CA-MRSA und HA-MRSA	52
Abbildung 25: spa-klonale Komplexe (spa-CCs) nach BURP-Analyse der mit MLST ST398 assoziierten <i>spa</i> -Typen	53
Abbildung 26: Verteilung von livestock-assoziierten MRSA innerhalb Deutschlands...	54

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Vergleich von HA-, CA- und LA-MRSA.....	8
Tabelle 2: Primer für die <i>spa</i> -Typisierung.....	18
Tabelle 3: PCR-Protokoll zur Amplifikation des <i>spa</i> -Gens.....	18
Tabelle 4: PCR-Protokoll für die Sequenzierungsreaktion.....	19
Tabelle 5: anamnestiche Risikofaktoren für eine MRSA-Besiedlung	26
Tabelle 7: die zehn häufigsten <i>spa</i> -Typen dieser Studie	29
Tabelle 8: die zehn häufigsten <i>spa</i> -klonalen Komplexe nach BURP-Analyse dieser Studie	30
Tabelle 9: die häufigsten <i>spa</i> -Typen nach Zentren sortiert.....	36
Tabelle 10: Die zehn häufigsten <i>spa</i> -Typen mit Angaben zu assoziierter Infektion	40
Tabelle 11: Häufigkeit und Verteilung der getesteten Virulenzfaktoren	42
Tabelle 12: Risikofaktoren für nosokomial erworbene MRSA bei PVL-positiven Isolaten	50

11 Literaturverzeichnis

- Aldeyab, M. A, Monnet, D. L., López-Lozano, J. M., Hughes, C. M., Scott, M. G., Kearney, M. P., Magee, F. A et al. (2008). Modelling the impact of antibiotic use and infection control practices on the incidence of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a time-series analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(3), 593–600.
- Argudín, M. A, Mendoza, M. C., Méndez, F. J., Martín, M. C., Guerra, B., & Rodicio, M. R. (2009). Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 2097–105.
- Baba, T., Kuwahara-Arai, K., Uchiyama, I., Takeuchi, F., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2009). Complete genome sequence of *Macrococcus caseolyticus* strain JCSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *Journal of Bacteriology*, 191(4), 1180–1190.
- Becker, K, Friedrich, A. W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G., & Eiff, C. von. (2003). Prevalence of Genes Encoding Pyrogenic Toxin Superantigens and Exfoliative Toxins among Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Blood and Nasal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1434–1439.
- Becker, K., & Von Eiff, C. (2011). *Staphylococcus, Micrococcus, and other Catalase-Positive Cocci*. *Manual of Clinical Microbiology*, (10), 308–330.
- Becker, K., & Sunderkötter, C. (2012). Hautinfektionen durch MRSA. *Epidemiologie und Klinik. Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 63(5), 371–380.
- Becker, K., Roth, R., & Peters, G. (1998). Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2548–2553.
- Becker, K., Pagnier, I., Schuhen, B., Wenzelburger, F., Friedrich, A. W., Kipp, F., Peters, G., et al. (2006). Does Nasal Cocolonization by Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains Occur Frequently Enough To Represent a Risk of False-Positive Methicillin-Resistant *S. aureus* Determinations by Molecular Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1), 229–231.
- Berger-Bächli, B., & Rohrer, S. (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Archives of microbiology*, 178(3), 165–171.
- Bisdorff, B., Scholhölter, J. L., Claußen, K., Pulz, M., Nowak, D., & Radon, K. (2012). MRSA-ST398 in livestock farmers and neighbouring residents in a rural area in Germany. *Epidemiology and Infection*, 140(10), 1800–1808.
- Blaiotta, G., Fusco, V., Von Eiff, C., Villani, F., & Becker, K. (2006). Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (*egc*) polymorphism and *spa* typing analyses. *Applied and environmental Microbiology*, 72(9), 6117–6123.

- Blomfeldt, A., Aamot, H. V., Eskesen, A. N., Müller, F., & Monecke, S. (2012). Molecular characterization of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients in a Norwegian university hospital. *Journal of clinical microbiology*, November, 1–11.
- Boye, K., & Westh, H. (2011). Variations in *spa* types found in consecutive MRSA isolates from the same patients. *FEMS microbiology letters*, 314, 101–105.
- Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone-Valentine leukocidin. *Laboratory investigation*, 87(1), 3–9.
- Chambers, H. F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 781–791.
- Clock, S. A., Cohen, B., Behta, M., Ross, B., & Larson, E. L. (2010). Contact precautions for multidrug-resistant organisms: Current recommendations and actual practice. *American journal of Infection Control*, 38(2), 105–111.
- Collery, M. M., Smyth, D. S., Twohig, J. M., Shore, A. C., Coleman, D. C., & Smyth, C. J. (2008). Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, *agr* locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 348–358.
- Collins, J., Rudkin, J., Recker, M., Pozzi, C., O’Gara, J. P., & Massey, R. C. (2010). Offsetting virulence and antibiotic resistance costs by MRSA. *The ISME journal*, 4(4), 577–84.
- Cuny, C., & Witte, W. (2011). Auftreten von MRSA mit negativem Nachweis für *mecA* (PCR) und Penicillin-Bindeprotein PBP2a (Agglutinationstest). *Epidemiologisches Bulletin des Robert-Koch-Instituts*, 38, 351–356
- Cuny, C., Köck, R., & Witte, W. (2013). Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany. *International Journal of Medical Microbiology*.
- Cuny, C., Nathaus, R., Layer, F., Strommenger, B., et al. (2009). Nasal Colonization of Humans with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without Exposure to Pigs. *PLoS one*, 4(8), 1–6.
- Czech, A., Yamaguchi, T., Bader, L., Linder, S., Kaminski, K., Sugai, M., & Aepfelbacher, M. (2001). Prevalence of Rho-inactivating epidermal cell differentiation inhibitor toxins in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(6), 785–788.
- David, M. Z., & Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 616–687.
- David, M. Z., Mennella, C., Mansour, M., Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2008). Predominance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pathogens causing skin and soft tissue infections in a large urban jail: risk factors and recurrence rates. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3222–3227.
- DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N., & Chambers, H. F. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 375, 1557–1568.

- de Sousa, M. A. & de Lencastre, H. (2003). Evolution of Sporadic Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Hospitals and Their Similarities to Isolates of Community-Acquired MRSA. *Journal of Clinical Microbiology* 41(8), 3806–3815.
- de Sousa, M. A. & de Lencastre, H. (2004). Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 40(2), 101–111.
- de Sousa, M. A., Boye, K., de Lencastre, H., Deplano, A., Enright, M. C., Etienne, J., Friedrich, A., et al. (2006). High Interlaboratory Reproducibility of DNA Sequence-Based Typing of Bacteria in a Multicenter Study. *Journal of clinical Microbiology*, 44(2), 619–621.
- Deurenberg, R. H., Nulens, E., Valvatne H., Sebastien, S., Driessen, C., Craeghs, J., et al. (2009). Cross-Border Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Euregio Meuse-Rhin Region. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 727–733.
- Deurenberg, R. H., & Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution*, 8(6), 747–763.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 16–34.
- Dufour, P., Gillet, Y., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Floret, D., Etienne, J., et al. (2002). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clinical Infectious Diseases*, 35(7), 819–824.
- Farr, A. M., Aden, B., Weiss, D., Nash, D., & Marx, M. A. (2012). Trends in hospitalization for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in New York City, 1997-2006: data from New York State's Statewide Planning and Research Cooperative System. *Infection control and hospital epidemiology*, 33(7), 725–31.
- Feingold, B. J., Silbergeld, E. K., Curriero, F. C., Cleef, B. A. G. L. Van, Heck, M. E. O. C., & Kluytmans, J. A. J. W. (2012). Livestock Density as Risk Factor for livestock-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 18(11), 1841–1849.
- Fowler, V. G., Olsen, M. K., Corey, G. R., Woods, C. W., Cabell, C. H., Reller, L. B., Cheng, A. C., et al. (2003). Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Archives of internal medicine*, 163(17), 2066–2072.
- Frénay, H. M., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M., van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Verhoef, J. & Mooi, F. R. (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 15(1), 60–64.
- García-Álvarez, L., Holden, M. T. G., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F. J., Curran, M. D., Walpole, E. et al. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet infectious diseases*, 11(8), 595–603.
- Gordon, R. J., & Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases.*, 46(5), 350–359.

- Graveland, H., Duim, B., van Duijkeren, E., Heederik, D. & Wagenaar, J. A. (2011). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *International Journal of Medical Microbiology*.
- Grundmann, H., Aanensen, D. M., van den Wijngaard, C. C., Spratt, B. G., Harmsen, D. & Friedrich, A. W. (2010). Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS medicine*, 7(1)
- Grundmann, H., de Sousa A., M., Boyce, J. & Tiemersma, E. (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*, 368, 874–885.
- Guinane, C. M., Penadés, J. R. & Fitzgerald, J. R. (2011). The role of horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* host adaptation. *Virulence*, 2(3), 241–243.
- Günther, J. & Kern, W. V. (2003). Solange sie noch wirken... Analyse und Kommentare zum Antibiotikaverbrauch in Deutschland. *Wissenschaftliches Institut der AOK, Universitätsklinikum Freiburg*.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Claus, H., Turnwald, D., & Vogel, U. (2003). Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for *spa* Repeat Determination and Database Management. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5442–5448.
- Holtfreter, S., Grumann, D., Schmutde, M., Nguyen, H. T. T., Eichler, P., Strommenger, B., Kopron, K. et al. (2007). Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2669–2680.
- Holzkecht, B. J., Hardardottir, H., Haraldsson, G., Westh, H., Valsdottir, F., Boye, K., Karlsson, S., et al. (2010). Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Iceland from 2000 to 2008: a challenge to current guidelines. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), 4221–4227.
- Hu, D., Maina, E. K., Omoe, K., Inoue, F., Yasujima, M. & Nakane, A. (2011). Superantigenic Toxin Genes Coexist with Specific Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 225(3), 161–169.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N. & Tsutsumimoto, K. (2001). Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), 1323–1336.
- Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S. & Oono, T. (2006). Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *Journal of dermatological science*, 42(3), 203–214.
- Jarraud, S., Mougél, C., Thioulouse, J., Lina, G., Nesme, X., Etienne, J. et al. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. *Infection and Immunity*, 70(2), 631–641.
- Jiménez, J. N., Ocampo, A. M., Vanegas, J. M., Rodríguez, E. A., Garcés, C. G., Patiño, L. A., Ospina, S. et al. (2011). Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellín, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(8), 980–985.

- Johnson, A. P. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(4), 43–48.
- Kriegeskorte, A., Ballhausen, B., Idelevich, E. A., Köck, R., Friedrich, A. W., Karch, H., Peters, G. et al. (2012). Human MRSA isolates with novel genetic homolog, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 18(6), 1016–1018.
- Kupfer, M., Jatzauwak, L., Monecke, S., Möbius, J. & Weusten, A. (2010). MRSA in a large German University Hospital: Male gender is a significant risk factor for MRSA acquisition. *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär*, 5(2), 1–8.
- Kurlenda, J., Grinholc, M. & Szweda, P. (2010). Lack of correlation between X region *spa* polymorphism and virulence of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Acta biochimica Polonica*, 57(1), 135–138.
- Köck, R., Brakensiek, L., Mellmann, a, Kipp, F., Henderikx, M., Harmsen, D., Daniels-Haardt, I. et al. (2009). Cross-border comparison of the admission prevalence and clonal structure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of hospital infection*, 71(4), 320–326.
- Köck, R., Harlizius, J., Bressan, N., Laerberg, R., Wieler, L. H., Witte, W., Deurenberg, R. H. et al. (2009). Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 28(11), 1375–1382.
- Köck, R., Siam, K., Al-Malat, S., Christmann, J., Schaumburg, F., Becker, K. & Friedrich, A. W. (2011). Characteristics of hospital patients colonized with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 versus other MRSA clones. *Journal of Hospital Infection*, 79(4), 292–296.
- Köck, R., Loth, B., Köksal, M., Schulte-Wülwer, J., Harlizius, J. & Friedrich, A. W. (2012). Persistence of nasal colonization with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farmers after holidays from pig exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4046–4047.
- Köck, R., Mellmann, A., Schaumburg, F., Friedrich, A. W., Kipp, F. & Becker, K. (2011). The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. *Deutsches Ärzteblatt international*, 108(45), 761–767.
- Köck, R., Schaumburg, F., Mellmann, A., Köksal, M., Jurke, A., Becker, K., & Friedrich, A. W. (2013). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. *PloS one*, 8(2), e55040.
- Lamand, V., Dauwalder, O., Tristan, A., Casalegno, J. S., Meugnier, H., Bes, M., Dumitrescu, O. et al. (2012). Epidemiological data of staphylococcal scalded skin syndrome in France from 1997 to 2007 and microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* associated strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 1–8
- Lattar, S. M., Tuchscher, L. P. N., Centrón, D., Becker, K., Predari, S. C., Buzzola, F. R., Robinson, D. A, Sordelli, D.O. (2012). Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis in Argentina and clonal distribution of the *cap5(8)* genes and of other selected virulence genes. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(10), 2559–2566.

- Laurent, F., Chardon, H., Haenni, M., Bes, M., Reverdy, M., Madec, J., Lagier, E. et al. (2012). MRSA harboring *mecA* Variant Gene *mecC*, France. *Emerging Infectious Diseases*, 18(9), 1465–1467.
- Lekkerkerk, W. S. N., Sande, M. A. B. Van der, Groenheide, A., & Haenen, A. (2012). Emergence of MRSA of unknown origin in the Netherlands. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 656–661.
- Liu, Y., Kong, F., Xiao, M., Wang, Q., O'Sullivan, M., Sintchenko, V., Ma, L. et al. (2010). Unexpected diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3628–3634.
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus Aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine*, 339(8), 520 – 532.
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265–1273.
- Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Brück, M., Holzinger, D., Varga, G., Roth, J. et al. (2010). *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS pathogens*, 6(1)
- McCormick, J. K., Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Review of Microbiology*, 55, 77–104.
- Medhus, A., Slette-meås, J. S., Marstein, L., Larssen, K. W., & Sunde, M. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the novel *mecC* gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 968–969.
- Mellmann, A., Friedrich, A. W., Rosenkötter, N., Rothgänger, J., Karch, H., Reintjes, R. & Harmsen, D. (2006). Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks. *PLoS medicine*, 3(3)
- Mellmann, A., Weniger, T., Berssenbrügge, C., Keckevoet, U., Friedrich, A. W., Harmsen, D. & Grundmann, H. (2008). 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*, 46(8), 2805–2808.
- Menegotto, F., González-Cabrero, S., Cubero, Á., Cuervo, W., Muñoz, M., Purificación, M., Simarro, M., et al. (2012). Clonal nature and diversity of resistance, toxins and adhesins genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* collected in a Spanish hospital. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 1751–1758.
- Miller, M., Cook, H. A., Furuya, E. Y., Bhat, M., Lee, M.-H., Vavagiakis, P., Visintainer, P. et al. (2009). *Staphylococcus aureus* in the community: colonization versus infection. *PLoS one*, 4(8)
- Monnet, D. L., Mackenzie, F. M., López-lozano, J. M., Beyaert, A., Camacho, M., Wilson, R., Stuart, D. et al. (2004). Antimicrobial Drug Use and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Aberdeen, 1996-2000. *Emerging Infectious Diseases*, 10(8)

- Montgomery, C. P., Boyle-Vavra, S. & Daum, R. S. (2010). Importance of the global regulators *Agr* and *SaeRS* in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. *PLoS one*, 5(12)
- Murchan, S., Kaufmann, M. E., Deplano, A., Ryck, R. De, Struelens, M., Zinn, C. E., Fussing, V. et al. (2003). 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*, 41(4), 1574–1585.
- Muto, C. A, Jernigan, J. A, Ostrowsky, B. E., Richet, H. M., Jarvis, W. R., Boyce, J. M. & Farr, B. M. (2003). SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infection control and hospital epidemiology*, 24(5), 362–386.
- Nhan, T.-X., Leclercq, R. & Cattoir, V. (2011). Prevalence of toxin genes in consecutive clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and clinical impact. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30, 719–725.
- Nienhoff, U., Kadlec, K., Chaberny, I. F., Verspohl, J., Gerlach, G.-F., Schwarz, S., Simon, D. et al. (2009). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 64(3), 660–662.
- Ogston, A. (1880). Micrococcus Poisoning. *Journal of Anatomy and Physiology*, xvi, 567.
- Okon, K. O., Basset, P., Uba, A., Lin, J., Oyawoye, B., Shittu, A. O., & Blanc, D. S. (2009). Cooccurrence of predominant Pantone-Valentine leukocidin-positive sequence type (ST) 152 and multidrug-resistant ST 241 *Staphylococcus aureus* clones in Nigerian hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9), 3000–3003.
- Ruimy, R., Maiga, A., Armand-Lefevre, L., Maiga, I., Diallo, A., Koumaré, A. K., Ouattara, K., et al. (2008). The carriage population of *Staphylococcus aureus* from Mali is composed of a combination of pandemic clones and the divergent Pantone-Valentine leukocidin-positive genotype ST152. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3962–3968.
- Rasigade, J.-P., Laurent, F., Lina, G., Meugnier, H., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J. et al. (2010). Global distribution and evolution of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981-2007. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(10), 1589–1597.
- Robert, J., Tristan, A., Cavalié, L., Decousser, J.-W., Bes, M., Etienne, J. & Laurent, F. (2011). Pantone-valentine leukocidin-positive and toxic shock syndrome toxin 1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a French multicenter prospective study in 2008. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(4), 1734–1739.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) (2012) Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2010«. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin
- Robert-Koch-Institut. (2011). Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010. *Epidemiologisches Bulletin*, 2011(26), 233–244.
- Sabat, A. J., Koksai, M., Akkerboom, V., Monecke, S., Kriegeskorte, A., Hendrix, R., Ehrlich, R. et al. (2012). Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains that

- carry a novel genetic homologue and important virulence determinants. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10), 3374–3377.
- Schaumburg, F., Köck, R., Mellmann, A., Richter, L., Hasenberg, F., Kriegeskorte, A., Friedrich, A. W. et al. (2012). Population Dynamics among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in Germany during a 6-Year Period. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10), 3186–3192.
- Schaumburg, F., Ngoa, U. A., Kösters, K., Köck, R., Adegnika, A. A., Kremsner, P. G., Lell, B. et al. (2011). Virulence factors and genotypes of *Staphylococcus aureus* from infection and carriage in Gabon. *Clinical microbiology and infection*, 17(10), 1507–1513.
- Schulz, J., Friese, A., Klees, S., Tenhagen, B. a, Fetsch, A., Rösler, U., & Hartung, J. (2012). Longitudinal study of the contamination of air and of soil surfaces in the vicinity of pig barns by livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5666–5671.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S. O., Smith, D. H., Waddington, M., Dodge, D. E., Bost, D. A. et al. (1999). Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3556–3563.
- Shopsin, B., Mathema, B., Alcabes, P., Lina, G., Matsuka, A., Martinez, J. & Kreiswirth, B. N. (2003). Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Children and Their Guardians. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 456–459.
- Shore, A. C., Deasy, E. C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R., et al. (2011). Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3765–3773.
- Shukla, S., Nixon, M., Acharya, M., Korim, M. T. & Pandey R. (2009). Incidence of MRSA surgical-site infection in MRSA carriers in an orthopaedic trauma unit. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 91(2), 225–228.
- Spohr, M., Rau, J., Friedrich, A., Klittich, G., Fetsch, A., Guerra, B., & Hammerl, J. A. (2011). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Three Dairy Herds in Southwest Germany. *Zoonoses and Public Health*, 58, 252–261.
- Statistisches Bundesamt (2011). Grunddaten der Krankenhäuser, *Fachserie* (Reihe 6.1.1).
- Stenheim, M., Ortvist, A., Ringberg, H., Larsson, L., Olsson Liljequist, B., Haeggman, S., Kalin, M. et al. (2010). Imported methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Sweden. *Emerging Infectious Diseases*, 16(2), 189–196.
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Weniger, T., Harmsen, D., Friedrich, A. W. & Witte, W. (2006). Assignment of *Staphylococcus Isolates* to Groups by *spa* Typing, Smal Macrorestriction Analysis , and Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), 2533–2540.

- Sugai, M., Enomoto, T., Hashimoto, K. & Matsumoto, K. (1990). A novel Epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): Purification and Characterization from *Staphylococcus Aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(1), 92–98.
- te Witt, R., van Belkum, A. & van Leeuwen, W. B. (2010). Molecular diagnostics and genotyping of MRSA: an update. *Expert review of molecular diagnostics*, 10(4), 375–80.
- Tenover, F. C., Tickler, I. A., Goering, R. V, Kreiswirth, B. N., Mediavilla, J. R. & Persing, D. H. (2012). Characterization of nasal and blood culture isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in United States Hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(3), 1324–30.
- Turlej, A., Hryniewicz, W. & Empel, J. (2011). Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. *Polish journal of microbiology* 60(2), 95–103.
- Valsesia, G., Rossi, M., Bertschy, S. & Pfyffer, G. E. (2010). Emergence of SCC*mec* type IV and SCC*mec* type V methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Pantone-Valentine leukocidin genes in a large academic teaching hospital in central Switzerland: external invaders or persisting circulators? *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 720–7.
- van Belkum, A., Melles, D. C., Nouwen, J., van Leeuwen, W. B., van Wamel, W., Vos, M. C., Wertheim, H. F. L. et al. (2009). Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution*, 9(1), 32–47.
- van den Akker, E. L. T., Nouwen, J. L., Melles, D. C., van Rossum, E. F. C., Koper, J. W., Uitterlinden, A. G., Hofman, A. et al. (2006). *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(6), 814–818.
- van Trijp, M. J. C. A, Melles, D. C., Snijders, S. V, Wertheim, H. F. L., Verbrugh, H. A., van Belkum, A. & van Wamel, W. J. (2010). Genotypes, superantigen gene profiles, and presence of exfoliative toxin genes in clinical methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66(2), 222–224.
- Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F. & Butaye, P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiology and Infection*, 138(5), 606–625.
- von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., Peters, G. (2001). nasal carriage as a source of *staphylococcus aureus* bacteremia. *New England Journal of Medicine*, 344(1), 11–16.
- von Eiff, C., Friedrich, A. W., Peters, G. & Becker, K. (2004). Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 49(3), 157–62.
- Weber, S. G., Gold, H. S., Hooper, D. C., Karchmer, A. W. & Carmeli, Y. (2003). Fluoroquinolones and the Risk for *Staphylococcus aureus* in Hospitalized Patients. *Emerging infectious diseases*, 9(11), 1415–1422
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A. & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet infectious diseases*, 5(12), 751–762.

- Wos-Oxley, M. L., Plumeier, I., Von Eiff, C., Taudien, S., Platzer, M., Vilchez-Vargas, R., Becker, K., et al. (2010). A poke into the diversity and associations within human anterior nares microbial communities. *The ISME journal*, 4(7), 839–51.
- Wulf, M. W. H., Sørnum, M., Nes, A. Van, Skov, R., Melchers, W. J. G., & Klaassen, C. H. W. (2008). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), 29–34.
- Wulf, M. W. H., Verduin, C. M., Van Nes, A., Huijsdens, X., & Voss, A. (2012). Infection and colonization with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 versus other MRSA in an area with a high density of pig farms. *European journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 61–65.
- Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Ohnishi, M., Murata, T., Nakayama, K., Asakawa, K. et al. (2001). Complete Nucleotide Sequence of a *Staphylococcus aureus* Exfoliative Toxin B Plasmid and Identification of a Novel ADP-Ribosyltransferase, EDIN-C. *Infection and Immunity*, 69(12), 7760–7771.
- Yamaguchi, T., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher, M., Takata, T., Ohara, M. et al. (2002). Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* Pathogenicity Island Which Encodes a Novel Exfoliative Toxin, ETD, and EDIN-B. *Infection and Immunity*, 70(10), 5835–5845.
- Yamasaki, O., Tristan, A., Yamaguchi, T., Sugai, M., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F. et al. (2006). Distribution of the exfoliative toxin D gene in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in France. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(6), 576–596.
- Yu, F., Li, T., Huang, X., Xie, J., Xu, Y., Tu, J., Qin, Z., et al. (2012). Virulence gene profiling and molecular characterization of hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolates associated with bloodstream infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 74(4), 363–368.
- Zanger, P., Nurjadi, D., Gaile, M., Gabrysch, S., & Kremsner, P. G. (2012). Hormonal contraceptive use and persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clinical Infectious Diseases*, 55(12), 1625–1632.
- Zanger, P., Nurjadi, D., Schleucher, R., Scherbaum, H., Wolz, C., Kremsner, P. G. & Schulte, B. (2012). Import and spread of Panton-Valentine Leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* through nasal carriage and skin infections in travelers returning from the tropics and subtropics. *Clinical Infectious diseases*, 54(4), 483–492.
- Zhang, S., Iandolo, J. J. & Stewart, G. C. (1998). The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiology Letters*, 168(2), 227–233.