

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Helge Karch-

**Molekularepidemiologische Untersuchung zur  
Prävalenz und Persistenz von Methicillin-  
resistenten *Staphylococcus aureus* bei ambulanten  
Patienten mit Hauterkrankungen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Kira Angela Anna Kröncke**

aus Bremerhaven

2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. A. W. Friedrich

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. M. Steinhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. H. Karch-

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. A. W. Friedrich

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. M. Steinhoff

### ZUSAMMENFASSUNG

Molekularepidemiologische Untersuchung zur Prävalenz und Persistenz von Methicillin-resistenten

*Staphylococcus aureus* bei ambulanten Patienten mit Hauterkrankungen

Kröncke, Kira Angela Anna

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist einer der häufigsten Erreger bakterieller Infektionen. Das Krankheitsspektrum reicht von Wund- und Hautinfektionen über Endokarditiden und Pneumonien bis zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie dem Toxic shock syndrome. Um adäquate Krankenhaushygiene betreiben und Maßnahmen umsetzen zu können, ist ein fundiertes Wissen über die MRSA-Isolate unerlässlich. Dies wird mittels Typisierung und Charakterisierung gewonnen. Die Prävalenz und molekulare Epidemiologie von MRSA bei dermatologischen, ambulanten Patienten ist bislang weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurden im Jahr 2007 insgesamt 207 Patienten auf MRSA hin untersucht. Dabei wurden 25 MRSA und 23 MSSA gefunden. Es konnten 22 unterschiedliche *spa*-Typen identifiziert werden. Die Nachweis-Inzidenz von MRSA lag damit bei 12,1%, die von MSSA bei 11,1%. Neun der weltweit 15 häufigsten *spa*-Typen traten in dieser Studie auf, wobei der Typ t032 mit 22,9% am häufigsten vorkam, gefolgt von t003, t004 und t008 (je 8,3%). Der Typ t032 zeigte als einziger *spa*-Typ ein häufigeres Vorkommen von MRSA in der Wunde als in der Nase. MSSA waren mit 64,3% bevorzugt in der Nase zu finden. Die Persistenz der MRSA-*spa*-Typen zeigte eine Tragedauer von einem bis zu 143 Tagen und eine Durchschnittstragedauer pro Patient von 10,5 Tagen (MRSA 15,6 Tage, MSSA 4,8 Tage). *Spa*-Typ t008 wurde in drei von vier Fällen über einen längeren Zeitraum (je 14, 57, 143 Tage) nachgewiesen und es lässt sich damit eine erhöhte Virulenz dieses *spa*-Typs vermuten. Die MRSA-*spa*-Typen waren homogener verteilt als die MSSA-Typen (MRSA: 7 *spa*-Typen; MSSA: 17 *spa*-Typen). Infektionen wurden zudem signifikant häufiger durch MRSA als durch MSSA ausgelöst. Die vorliegenden Daten sprechen für eine klonale Heterogenität der MRSA in der Region Münster und die sporadisch vorkommenden *spa*-Typen zeigen möglicherweise die Entstehung neuer Stämme in dieser Region an. MRSA hat eine größere klinische und epidemiologische Bedeutung als MSSA. Es gibt Subtypen-spezifische Unterschiede. MRSA scheint also nicht gleich MRSA zu sein.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12.2011



## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2	Epidemiologie und Übertragungswege	2
1.3	Klinik, Therapie und Sanierungsmaßnahmen	3
1.4	Pathogenitätsfaktoren	6
1.4.1	Zelloberflächenstrukturen	6
1.4.2	Extrazelluläre Produkte	7
1.5	Antibiotikaresistenz	8
1.6	Diagnostik	10
1.7	Zielsetzung der Arbeit	10
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>12</b>
2.1	Materialien	12
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	12
2.1.2	Laboreinrichtungen und Geräte	13
2.1.3	Gebrauchslösungen	14
2.1.4	Synthetische Oligonukleotide	15
2.1.5	Nährmedien	15
2.1.6	Software	15
2.2	Methoden	16
2.2.1	Patientengut	16
2.2.2	Bakterienanzucht	16
2.2.3	Amplifikation und Detektion	16
2.2.3.1	DNA-Präparation	17
2.2.3.2	Polymerasekettenreaktion	17
2.2.4	Sequenzierung	18
2.2.4.1	DNA-Extraktion	18
2.2.4.2	Amplifikation und Aufreinigungsverfahren	19
2.2.4.3	DNA- Sequenzierung	19
2.2.4.4	Sequenzanalyse	20
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>22</b>
3.1	Epidemiologie	22
3.1.1	Geschlechtsverteilung	22
3.1.2	<i>spa</i> -Typ-Verteilung	24
3.1.3	<i>spa</i> -Typ-Verteilung bzgl. Methicillin-Resistenz und –Sensitivität	26
3.1.4	Patientenalter versus <i>spa</i> -Typ	27
3.2	<i>spa</i> -Typen	30
3.2.1	Erstauftreten der <i>spa</i> -Typen	30
3.2.2	Tragedauer der <i>spa</i> -Typen	33
3.2.3	Lokale Besiedlung der <i>spa</i> -Typen	37
3.2.4	<i>spa</i> -Typ versus Risikofaktoren	39

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b>	<b>I</b>
<b>10.1</b>	<b>Erfassung von Risikofaktoren</b>	<b>I</b>

---

## 1 EINLEITUNG

Methicillin-resistente Stämme des *S. aureus* sind frequente Verursacher von Infektionen in Krankenhäusern und zunehmend auch in der Bevölkerung. Ihr Vorkommen wurde bereits 1961 in Großbritannien entdeckt, nur zwei Jahre nach der Einführung des semisynthetischen Penicillin Methicillin zur Behandlung von Penicillin-resistentem *S. aureus* [50]. 1967 kam es in den USA zum ersten großen Ausbruch von MRSA in einem Krankenhaus in Boston [3, 4]. Seitdem ist die MRSA-Prävalenz weltweit kontinuierlich gestiegen, ist jedoch national und regional sehr unterschiedlich verteilt.

Allein in den USA sind im Jahr 2006 circa 19.000 Menschen an MRSA-Infektionen verstorben und die Zahl der stationär behandelten MRSA-Infektionen verdoppelte sich in von 127.000 Menschen im Jahr 1999 auf 278.000 Patienten im Jahr 2005 [57, 56]. Es wird geschätzt, dass in Deutschland jährlich zwischen 700 und 1.500 Personen an einer Infektion mit MRSA versterben, wobei die Zahl der Infizierten bei 40.000 – 50.000 liegt.

Da mit einer *S. aureus* – Infektion die Morbidität und die Mortalität der Patienten durch schwerwiegende Erkrankungen wie Endokarditis, Sepsis oder Staphylococcal Scaled Skin Syndrome ansteigen, sowie nicht zuletzt auch die Kosten für das Gesundheitssystem, hat die Erforschung dieses Keims einen hohen Stellenwert in der gegenwärtigen Forschung [85], insbesondere, da bei dem Methicillin-resistenten *S. aureus* die Therapieoptionen stark eingeschränkt sind.

### 1.1 Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*

MRSA zeichnet sich durch Resistenzen gegenüber allen Betalaktamantibiotika aus, darüber hinaus können Resistenzen gegen Aminoglykoside, Makrolide oder Fluorchinolone hinzukommen. Die Resistenz ist definiert als minimale Oxacillin-Hemmkonzentration von  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ . Sie ist auf das *mecA*-Gen zurückzuführen, welches sich auf einem mobilen genetischen Element, dem Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*), befindet. Das *mecA* Gen wird durch den Repressor *MecI* und den Transducer *MecRi* reguliert [22]. Derzeit sind sieben SCC*mec*-Typen bekannt. Das *mecA*-Gen kodiert für ein modifizierte Penicillin-Bindeprotein 2a. Das veränderte Protein hat eine geringe Affinität, Betalaktamantibiotika in die Zellwand des Bakteriums einzubauen [12], wodurch das Antibiotikum seine Wirkung verliert. Die phänotypische Resistenzausprägung ist häufig heterogen und wird durch die Gene *bla* (Betalaktamase) und *fem* (factors essential for methicillin resistance) geregelt [72].

Interessanterweise haben die Infektionen, die durch MRSA verursacht wurden, nicht die Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) – Infektionen ersetzt, sondern sind additiv hinzugekommen [108, 9].

Die Begriffe MRSA und ORSA (für Oxacillin-resistenter *S. aureus*) werden synonym verwendet, wobei in Europa die Resistenz auf Oxacillin, Flucloxacillin und Cefotaxim getestet wird.

Die Kolonisation oder Infektion mit MRSA ist seit dem 1. Juli 2009 bei dem zuständigen Gesundheitsamt meldepflichtig. Darüber hinaus besteht Meldepflicht, wenn ein endemischer Zusammenhang von gehäuften nosokomialen Infektionen vermutet wird (laut § Abs. 3 des Infektionsschutzgesetzes) [99, 67].

## 1.2 Epidemiologie und Übertragungswege

Nachdem MRSA SCCmec Typ I im Jahr 1961 entdeckt wurde, verbreitete er sich in den 1960er Jahren über Europa und in den 1970er Jahren weltweit. Auch SCCmec Typ II wurde nach seiner Entdeckung 1982 in Japan weltweit nachgewiesen. Bis heute sind des Weiteren die SCCmec Typen III, IV, V, VI und VII bekannt [49, 25, 7], die sich in ihrer Größe von 20,9 bis 66,9kb unterscheiden.

Die SCCmec Typ I – III werden vorwiegend mit Healthcare-Associated (HA-) MRSA in Zusammenhang gebracht. HA-MRSA bedeutet, dass das Bakterium nach mehr als 48-stündigem Krankenhausaufenthalt erworben wurde. Die Typen IV, V und VII sind mit Community-Acquired (CA-) MRSA assoziiert, wobei in einigen Studien davon bereits Abweichungen gefunden worden sind und es nun besonders in den USA vermehrt in Krankenhäusern auftritt [19, 49, 14].

CA-MRSA, das zum ersten Mal 1993 in Australien auftrat, unterscheidet sich genotypisch und phänotypisch von HA-MRSA, beinhaltet unterschiedliche Risikofaktoren, zeigt nur Resistenz gegen Betalaktamantibiotika und trägt das Panton-Valentine-Leukozidin-Gen, das Ursache für nekrotische Wunden sein kann [114, 69, 115].

Zur MRSA-Entstehung gibt es unterschiedliche Theorien; wahrscheinlich ist, dass SCCmec mehrfach in unterschiedliche *S. aureus*-Stämme übergegangen ist [28,84].

Weltweit ist die MRSA-Prävalenz sehr unterschiedlich verteilt, so ist sie in Ländern wie Japan, USA, Spanien, Italien und in südeuropäischen Staaten mit 30-80% sehr hoch; in Skandinavien (<1%) und den Niederlanden (<0,5%) ist sie sehr gering [117, 41, 86]. Die Arbeitsgemeinschaft „Empfindlichkeitsprüfungen und Resistenz“ der Paul-Ehrlich-

Gesellschaft ist seit 1990 an einer Studie über die Resistenzlage in Europa beteiligt und diese zeigt einen Anstieg der MRSA-Prävalenz in Deutschland von 1,7% im Jahr 1990 über 15,2% 1998 auf 22,6% im Jahr 2004 und einen leichten Abfall auf 19,5% im Jahr 2008 [62, 61, 112]. Im Jahr 2010 war laut Robert-Koch-Institut die MRSA-Inzidenz in ganz Deutschland bei 3,99/100.000 Einwohner (insgesamt 3273 MRSA-Fälle), davon 4,91/100.000 Einwohner in Nordrhein-Westfalen (881 Personen) und 3,91/100.000 Einwohner (102 Fälle) im Münsterland [46]. Darüber hinaus ist auch der Anteil von MRSA in Blutkulturen gestiegen [41]. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, HA-MRSA-Träger zu sein, nicht für alle Personen gleich, denn es gibt gewissen Risikofaktoren. Zu diesen zählen eine positive MRSA-Anamnese oder der Kontakt zu einem MRSA-Träger, ein mindestens 24-stündiger Aufenthalt in einem Altenheim oder Krankenhaus innerhalb der letzten sechs Monate, des Weiteren eine chronische Pflegebedürftigkeit, eine tiefe Weichteilinfektion, eine chronisch offene Wunde oder ein Ulcus, Antibiotikaeinnahme innerhalb des letzten halben Jahres, sowie liegende Katheter oder Dialysepflichtigkeit [42]. Zu den Risikofaktoren für CA-MRSA-Infektion gehören Teilnehmer von Teamsportarten, Kinder, Häftlinge, Wehrdienstleistende sowie tätowierte Personen [10, 79, 80, 38].

Der Mensch stellt das natürliche Reservoir für *S. aureus* dar, wobei 20% der Bevölkerung ständig, 20% nie und 60% intermittierend von einer MRSA-Kolonisation betroffen sind [58]. Die Übertragung von MRSA findet vor allem in Krankenhäusern über die Hände der Mitarbeiter statt, die aufgrund unzureichender Hygiene die Bakterien von MRSA-Trägern auf andere Patienten verschleppen [83]. Darüber hinaus wurde bereits von einer direkten Übertragung von MRSA zwischen Schweinen und Menschen auf einer Schweinefarm berichtet, wobei besonders besorgniserregend ist, dass Schweine anscheinend ein Reservoir für MRSA darzustellen scheinen [54].

### **1.3 Klinik, Therapie und Sanierungsmaßnahmen**

Die klinische Bandbreite von MRSA-Infektionen ist vielgestaltig und kann eine ganze Reihe von klassischen Infektionskrankheiten hervorrufen, wie zum Beispiel Furunkel, Lebensmittelvergiftungen oder Endokarditiden, wobei einige der Erkrankungen lebensbedrohlich sein können.

Bei einer MRSA-Kolonisation zeigt der Patient keine Symptome. Die Erreger vermehren sich auf seiner Schleimhaut, lösen aber keine Erkrankung aus. Anders ist dies bei der MRSA-Infektion, bei der die Bakterien die Haut- oder Schleimhautbarriere überwunden haben und

somit Zugang zum angrenzenden Gewebe oder zur Blutbahn haben. Ob es zu einer Infektion kommt, ist abhängig von den Virulenzfaktoren des MRSA und den Abwehrkräften des Trägers. Das Risiko, an einer MRSA-Infektion zu erkranken, ist bei einer Kolonisation mit diesem Erreger um das Vierfache erhöht [103]. Dies ist der Grund dafür, dass bei MRSA-Trägern eine Dekolonisation vorgenommen wird.

Die durch Staphylokokken bedingten Erkrankungen lassen sich in invasive und toxinbedingte Prozesse einteilen. Zu den invasiven Erkrankungen, bei der die Schädigung durch den spezifischen *S. aureus*-Stamm und die Gesamtheit seiner Virulenzfaktoren hervorgerufen wird, zählen lokale Infektionen der Haut und Schleimhaut, wie Mastitis puerperalis und Furunkel, darüber hinaus auch Infektionen innerer Organe, wie Osteomyelitis, Fremdkörperinfektionen oder Endokarditis. Bei den Toxin-vermittelten Erkrankungen ist ein bestimmtes Toxin für die Schädigung verantwortlich. Zu diesen Krankheitsbildern zählen die Staphylokokken-Enterokolitis und die Staphylokokken-Enteritis. Des Weiteren gibt es Krankheitsbilder wie das staphylokokkenbedingte Lyell-Syndrom und das Toxic Shock Syndrome, die eine Übergangsform zwischen invasiv und toxinbedingt darstellen [65, 40, 72]. Jedes oberflächliche oder tiefe Eindringen des MRSA kann zu einer Bakteriämie führen und so eine Endokarditis oder Sepsis verursachen. In einer Studie in den USA wurden in einem Zeitraum von 1995-2002 über 24.000 Patienten mit nosokomialer Bakteriämie untersucht. Dabei stieg der Anteil der durch MRSA verursachten Bakteriämien von 22% im Jahr 1995 auf 57% im Jahr 2001 [124]. In der Literatur besteht ein allgemeiner Konsensus darüber, dass die MRSA-Bakteriämie häufiger zum Tod führt als die MSSA-Bakteriämie [105].

Durch die Bakteriämie kann es zu einer infektiösen Endokarditis kommen, die akut oder subakut verlaufen kann. Ein erhöhtes Risiko, an dieser Infektion zu erkranken, haben Personen, die sich intravenöse Drogen applizieren, ältere Menschen, Personen mit prothetischen Herzklappen, sowie stationäre Patienten. Die akute Form ist durch hohes Fieber, Schüttelfrost, allgemeines Krankheitsgefühl, BSG-Erhöhung und Milzvergrößerung gekennzeichnet. Die subakute Endokarditis entwickelt ist schleichend über Wochen und Monate und zeigt eine Anämie und Hämaturie, einen starken Appetit- und Gewichtsverlust, sowie Gelenkschmerzen und Trommelschlegelfinger. Die Diagnose wird durch das klinische Bild, Laborparameter und den Erregernachweis in Blutkulturen gestellt. Auch hier ist die Mortalität der durch MRSA verursachten Endokarditis höher, als die der durch MSSA verursachten [39]. Die Mortalitätsrate von Patienten mit infektiöser Endokarditis ist relativ hoch und sie scheint noch höher zu sein, wenn *S. aureus* der Erreger ist. [29, 60].

Darüber hinaus ist *S. aureus* der häufigste Krankheitserreger von nosokomialen Haut- und Weichteilinfektionen. In einer Studie aus den USA und Kanada waren 30% der *S. aureus* - Isolate von infizierten Wunden gegen Methicillin resistent, wohingegen es drei Jahre zuvor nur 24% waren [95, 24]. Ulzera werden in der Regel durch eine Sauerstoffmangelnekrose ausgelöst. Diese kann durch eine chronische Beinveneninsuffizienz verursacht werden, aber auch Folge einer arteriellen Verschlusskrankheit oder neuropathischer Ursache sein [110]. Typischerweise ist das Ulcus im Bereich des Innenknöchels lokalisiert, stellt sich rund und solitär dar und ist nur mäßig schmerzhaft. Häufig kommt es erst bei vorhandenem Ulcus zu einer MRSA-Infektion oder -Kolonisation. Ulzera neigen zur Ausbreitung und zu Rezidiven. Stanaway et al. haben den Zusammenhang zwischen nasaler MRSA-Besiedlung und durch Diabetes verursachten Ulzera untersucht. Dabei fanden sie heraus, dass die Kolonisation mit MRSA in der Nase ein signifikanter Risikofaktor für eine Infektion des Ulcus darstellt [109]. Bei der Behandlung einer MRSA-Besiedlung wird zunächst ein Kolonisationsstatus erhoben. Je nach Lokalisation wird eine Sanierung für fünf bis sieben Tage begonnen, worauf eine Pause von circa drei Tagen folgt, um falsch negative Ergebnisse durch antibakterielle Substanzen zu vermeiden. Danach werden an drei aufeinander folgenden Tagen von vorher kolonisierten Stellen Abstriche gemacht. Da es bei bis zu 50% der Patienten zu einer Rekolonisation kommt, werden im Laufe eines Jahres drei Kontrollabstriche gemacht (nach 1, 3-6 und 12 Monaten). Erst nach dem letzten negativen Abstrich wird der Patient als MRSA-frei bezeichnet [42].

Die Therapie einer nasalen MRSA-Kolonisation erfolgt durch eine topisch angewendete antibiotische Nasensalbe, da durch eine systemische Anwendung zu geringe Wirkstoffspiegel an Haut- und Schleimhaut erreicht werden würden. Darüber hinaus müssen desinfizierende Haarshampoos verwendet werden und für die Haut- und Schleimhautoberfläche werden Antiseptika empfohlen [89]. Nicht zuletzt sind allgemeine hygienische Maßnahmen einzuhalten. Dazu gehört das regelmäßige Wechseln von Textilien und Hygieneartikeln (z.B. Handtücher und Zahnbürste) [55].

Bei einer MRSA-Infektion wird mit systemischer Antibiotikagabe verfahren. Alle MRSA haben eine Resistenz gegen Betalaktamantibiotika, allerdings können vor allem HA-MRSA noch eine Reihe weiterer Resistenzen entwickeln. Aus diesem Grund müssen Reserveantibiotika verwendet werden wie die Glykopeptide Vancomycin und Teicoplanin, die wegen ihrer geringen Bioverfügbarkeit intravenös verabreicht werden müssen. Allerdings zeigen einige MRSA-Stämme auch schon Resistenzen gegenüber den Glykopeptiden [13, 16]. Sie werden Vancomycin-resistente *S. aureus* (VRSA) genannt. Daraus ergibt sich die

Notwendigkeit bei Infektionen mit Glykopeptid-intermediären *S. aureus* (GISA) Antibiotika wie Linezolid, Tigecyclin, Quinupristin/ Dalfopristin oder Daptomycin zu verwenden, wobei auch schon Linezolid-Resistenzen bekannt sind [113].

Ein ganz anderer Therapieansatz ist der Einsatz von Maden zur MRSA-Beseitigung. In einer Studie von Bowling et al. wurden von 13 mit MRSA besiedelten Ulzera 12 durch die Anwendung von Maden dekolonisiert [2].

Aufgrund der zum Teil schweren Krankheitsbilder und den eingeschränkten Therapieoptionen, ergibt sich die Notwendigkeit von Screeningverfahren, das strikte Einhalten von Hygienemaßnahmen durch das Personal im Krankenhaus, Kontaktisierungsmaßnahmen von MRSA-Trägern und deren Dekolonisierung.

## **1.4 Pathogenitätsfaktoren**

Bei der Pathogenese von MRSA-Infektionen spielen eine ganze Reihe von strukturellen und sezernierten Virulenzfaktoren eine Rolle, wobei ein Faktor mehrere Pathogenitätsfunktionen aufweisen kann und umgekehrt eine Funktion durch mehrere Faktoren ausgelöst werden kann. Die Virulenz des Erregers stellt sich durch verschiedene Oberflächenproteine und Toxine dar, wobei unterschiedliche MRSA-Stämme differente Adhäsionsproteine und Toxine aufweisen können und sich die Fähigkeit zur Biofilmbildung und Phagozytose unterscheiden kann.

Die Gene, die für die Virulenz und Resistenz verantwortlich sind, befinden sich auf einem etwa 2800Bp großen ringförmigen Chromosom und den extrachromosomalen Elementen, bestehend aus Prophagen, Plasmiden und Transposons [72].

### **1.4.1. Zelloberflächenstrukturen**

Die Adhäsionsfaktoren von MRSA werden unter dem Begriff „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMMs) zusammengefasst und bewirken eine Anhaftung an das Gewebe. Zu den MSCRAMMs gehören der Clumpingfaktor (Fibrinogenrezeptor), die Fibronectin-Bindeproteine A und B, das Kollagen-Bindeprotein und das Elastin-Bindeprotein. Vermutlich spielen die MSCRAMMs eine entscheidende Rolle bei dem Beginn von Knochen-, Gelenks- und endovaskulären Infektionen [31].

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor ist das 42kD schwere Protein A, das der Phagozytose entgegen wirkt, indem es den Fc-Teil von Antikörpern bindet. Zudem haben die meisten *S.*

*aureus*-Stämme eine Polysaccharidkapsel (meist Serotyp 5 oder 8), die ebenfalls antiphagozytotisch wirkt.

Durch Bildung eines interzellulären Adhäsins aus Poly-N-Acetylglucosamin kann ein Biofilm gebildet werden, in dem Mikrokolonien („Small Colony Variants“, SCV) wachsen, die sich durch ein verzögertes Wachstum, stark verminderte Stoffwechselaktivität und eine geringe Koloniegröße auszeichnen. Durch diesen Biofilm sind die Erreger vor der körpereigenen Abwehr geschützt und besitzen somit eine erhöhte Persistenz [65].

#### **1.4.2. Extrazelluläre Produkte**

Durch die Produktion von Fibrinolyse löst *S. aureus* ein zuvor schützendes Fibringerinnsel auf und kann sich weiter im Gewebe vermehren. Um nun bei einer Infektion in das Gewebe eindringen zu können und es zu zerstören, produziert der Erreger Proteasen, Lipasen, Nukleasen, Phospholipase C, Metalloproteasen und Hyaluronidasen. *S. aureus* stellt darüber hinaus das Toxin Leukozidin her, das Granulozyten und Makrophagen schädigt und somit ein bedeutsamer Virulenzfaktor ist, da es das Immunsystem schwächt. Ein Typus davon ist das Exotoxin Panton-Valentine-Leukozidin, das in der Regel bei CA-MRSA anzutreffen ist. Es bildet Poren in der Zellwand von Leukozyten und ist mit rezidivierend auftretenden Furunkeln, Abszessen und nekrotisierender Pneumonie assoziiert [31].

Die Hämolyse von *S. aureus* werden in  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  eingeteilt. Das  $\alpha$ -Hämolyse bewirkt das Zugrundegehen von Thrombozyten, Endothelzellen und einigen Epithelzellen; das  $\beta$ - und  $\gamma$ -Hämolyse wirkt hämolysierend und zytotoxisch. Des Weiteren bilden einige *S. aureus*-Stämme Exfoliativproteine, die zu einer Ablösung der Haut zwischen dem Stratum spinosum und Stratum granulosum führen können und dadurch das Staphylococcal Scaled Skin Syndrome auslösen.

Die Enterotoxine von *S. aureus* werden in A, B, C 1-3, D, E, G und H unterschieden, wobei für den Menschen die Enterotoxine A und B von großer Bedeutung sind, da diese Lebensmittelvergiftungen auslösen. Da sie sehr hitzestabil sind, können die Toxine trotz eines Erhitzens auf 100°C persistieren. Häufige Infektionsquellen sind Milch- und Eiprodukte, sowie Schweinefleisch [65, 40].

Einige wenige *S. aureus*-Stämme bilden das chromosomal kodierte Toxic shock syndrome toxin (TSST), das bei Lymphozyten eine vermehrte Ausschüttung von Zytokinen bewirkt und damit ein toxisches Schocksyndrom hervorrufen kann.

## 1.5 Antibiotikaresistenz

Penicillin wird seit Anfang der 1940er Jahre vermehrt verwendet. 1945 kam es zu der ersten Isolierung eines Penicillin-resistenten *S. aureus*-Stammes, der durch den Besitz einer  $\beta$ -Laktamase seine Resistenz erworben hatte. Daraufhin kam es im Jahre 1960 zur Einführung des Oxacillin, welches durch die  $\beta$ -Laktamase nicht ausgeschaltet werden konnte, da dessen Isoxazolyl-Seitenkette als Substrat für die  $\beta$ -Laktamase galt. Jedoch kam es bereits ein Jahr später zur Entdeckung des ersten Oxacillin- und Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stammes. MRSA-Stämme, die sich durch eine vermehrte Resistenz gegenüber Glykopeptiden auszeichnen (GISA – Glykopeptid-Intermediärer-*S. aureus*), traten 1997 zum ersten Mal in den USA und Japan, sowie 1998 in Deutschland auf. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts, im Jahr 2002, wurde in den USA erstmalig ein Vancomycin-resistenter *S. aureus* nachgewiesen, der das *vanA*-Gen der Enterokokken im Genom trägt [97].

Der Anteil an MRSA hat in den Jahren 1990 bis 2004 stetig zugenommen (1990: 1,7%; 1995: 12,7%; 1998: 15,2%; 2004: 23%) [88, 43].

*S. aureus* erwarb seine erste Resistenz mittels des *bla*-Gens, welches für eine  $\beta$ -Laktamase kodiert und den Penicillin-Ring durch Spaltung inaktiviert. Dies führt zu einer Resistenz des *S. aureus* gegenüber Amoxicillin, Mezlocillin, Penicillin und Piperacillin. Da bald darauf jedoch eine Behandlung der Patienten mit „penicillinasefesten“ Penicillinen (Oxacillin und Methicillin), Cephalosporinen, sowie Carbapenemen möglich war, spielte die bis dato erworbene Resistenz des *S. aureus* zunächst wieder eine untergeordnete Rolle. Es kam allerdings zu einer weiteren Mutation des *S. aureus*. Es wurde das Penicillin-Bindeprotein 2a ausgebildet, das zu einer veränderten Affinität für den Einbau von  $\beta$ -Laktamantibiotika geführt hat. Das Gen, das für die Ausbildung des Penicillin-Binde-Proteins 2a verantwortlich ist, ist das *mecA*-Gen, welches wiederum durch verschiedene Faktoren reguliert wird (*agr*, *aux*, *blaI*, *blaR*, *femA-F*, *fnt*, *Ilm*, *mecl*, *sar*) und gemeinsam mit weiterer *mec*-assoziiierter DNA zu der Multiresistenz von MRSA führt. Die Multiresistenz wird somit durch den flexiblen Einbau von genetischen Elementen ermöglicht.

MRSA verfügt mittlerweile auch über Resistenzen gegen Aminoglykoside, Tetrazykline sowie Erythromycin (*ermA*-Gen) und ist durch Punktmutationen ebenfalls resistent geworden gegenüber Chinolonen und Rifamycinen [97].

Die SCC*mec* Typen II und III weisen im Gegensatz zu den SCC*mec* Typen I, IV, V, VI und VII nicht nur eine Resistenz gegen Betalaktam-Antibiotika auf, sondern auch gegenüber weiteren Chemotherapeutika, da sie zusätzlich zu *mecA* weitere Resistenzgene auf Plasmiden und Transposons besitzen. So besitzt SCC*mec* II durch das Plasmid pUB110 eine Resistenz

gegen mehrere Aminoglykoside und aufgrund des Transposons Tn554 auch gegenüber einigen Makroliden, Linkosamiden und Streptogramin. Tetrazykline und Cadmium zeigen aufgrund des pI258 und  $\Psi$ Tn554 keine Wirkung bei der Anwendung bei SCCmec Typ III [7].

Eine Übersicht über den chronologischen Verlauf der Resistenzentwicklung verschafft Tabelle 1 [59].

<b>Tabelle 1: MRSA-Chronologie</b>	
1942	Entdeckung von Penicillin; erste Penicillinresistenz von <i>S. aureus</i>
50er Jahre	Zunahme von <i>S.aureus</i> -Stämmen mit Penicillinresistenz
1956	Entdeckung von Vancomycin
1958	Freigabe von Vancomycin für den klinischen Gebrauch durch die „Food and Drug Administration“ (FDA)
60er Jahre	Einführung der Anti-Staphylokokken-Penicilline (Methicillin-Familie); Auftreten von Methicillinresistenten <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)
70er Jahre	Zunahme des MRSA-Anteils
1977	Behandlung der pseudomembranösen Colitis (Auslöser <i>Clostridium difficile</i> ) mittels oralem Vancomycin
80er Jahre	Endemische Ausbreitung von MRSA, vor allem in US-amerikanischen Krankenhäusern; dort häufiger Gebrauch von Vancomycin zur Behandlung von MRSA, insbesondere in chirurgischen Abteilungen
1986	Hochgereinigtes Vancomycin ist einsetzbar; hierdurch wird die Anwendung erleichtert und die Toleranz erhöht
1987	Dokumentation des ersten Falles von Glykopeptidresistenz bei koagulase-negativen Staphylokokken
1988	Nachweis von glykopeptidresistenten Enterokokken
1996	Nachweis des ersten Falles einer GISA-Infektion
1997-99	Dokumentationen über MRSA-Infektionen, die außerhalb des Krankenhaus-Settings erworben wurden; Berichte über Infektionen mit GISA und VISA in mindestens vier Kontinenten
2000-05	Anstieg des MRSA-Anteils auf 20%
2005-10	Etablierung der Präventionstherapie durch regionale MRSA-Netzwerke in Deutschland; MRSA auf mittelhohem Niveau

## 1.6 Diagnostik

Zur MRSA-Diagnostik wird zunächst ein Abstrich der Nase und einer etwaigen Wunde durchgeführt und dieser wird auf ein MRSA-Screeningmedium ausgestrichen. Der Nährboden wird nun für 48 Stunden bebrütet, wobei die erste Beurteilung bereits nach 24 Stunden stattfindet. Ein sicher negatives Ergebnis liegt jedoch erst nach 48 Stunden vor.

Für den MRSA-Nachweis muss sichergestellt werden, dass es sich um *S. aureus* handelt. Dazu wird ein Koagulase-Agglutinationstest durchgeführt, bei dem nach Vermischung einiger Bakterienkolonien mit fibrinogenhaltigem Plasma, makroskopisch sichtbar eine Gerinnung von Fibrinogen stattfindet, wenn es sich um *S. aureus* handelt. Bei Auswahl des Test-Kits muss darauf geachtet werden, dass zusätzlich auch Antikörper gegen Kapselpolysaccharide oder weitere Makromoleküle der Zellwand gerichtet sind, da einige MRSA-Stämme den Verklumpungsfaktor nicht oder nur schwach exprimieren. Eine weitere Variante zur Unterscheidung von Koagulase-positiven und Koagulase-negativen Staphylokokken lässt sich durch Sequenzierung der 16S RNA durchführen, darüber hinaus ist die Unterscheidung durch die Gene für die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase und Hitze-Schock-Protein 60 möglich. Bei der PCR erfolgt der *S. aureus*-Nachweis durch Beweis einer Sequenz, die die Koagulase-negativen Staphylokokken nicht aufweisen sowie durch das *nuc*-Gen.

Zum Nachweis der Resistenz sollten sowohl kulturelle als auch molekularbiologische Verfahren eingesetzt werden. Der Latexagglutinationstest ist ein MRSA Schnelltest, der die Oxacillinresistenz mit fast 90%iger Sicherheit angibt. Auch durch die Automatenysteme Phoenix und VITEC-2 kann das Methicillinresistenzgen nachgewiesen werden [68, 78, 100]. Der *mecA*-Genachweis erfolgt mittels PCR, wobei auch weitere Resistenzgene durch die Multiplex-PCR nachgewiesen werden können [32].

Bei einem positiven Befund sollte eine Genotypisierung durchgeführt werden. Dies kann durch die Pulsfeldgel-Elektrophorese, die Multilocussequenz-, die *SCCmec*- oder die *spa*-Typisierung erfolgen [22].

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Trotz ansteigender MRSA-Inzidenz und damit verbundenen stark erhöhten Kosten für das Gesundheitssystem, findet derzeit kein flächendeckendes MRSA-Screening bei Patienten mit nachgewiesenen Risikofaktoren statt. Da ohne ein Screening auch keine Keim-Eradikation stattfinden kann, kann der Keim sich weiter verbreiten.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Jahr 2007 833 Abstrichproben von Patienten der Hautklinik Münster gesammelt. Die Patienten wiesen einen oder mehrere Risikofaktoren für eine MRSA-Besiedlung auf.

Es soll die Inzidenz des *S. aureus* dargestellt werden. Des Weiteren soll eine Analyse des *spa*-Typs hinsichtlich des Erstauftretens, der Tragedauer, des Alters, des Geschlechts der Patienten und des Ortes der Besiedlung durchgeführt werden.

Zudem soll die Inzidenz der MRSA- und MSSA *spa*-Typen in der Hautklinik und etwaige Abweichungen von der globalen *spa*-Häufigkeit nachgewiesen werden.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Abstrichtupfer Technical service consultants, Heywood (Großbritannien)

Einmalimpfeschlingen 10µl loops, Nunc, Roskilde (Dänemark)

Pastorex Staph Plus Bio-Rad, Marnes-la-Coquette (Frankreich)

NEBuffer 1, New England Biolabs, Frankfurt

PCR-Puffer (100 mM HCl, pH 8,3/25°C, 500 mM KCl, autoklaviert) PE Applied Biosystems, Weiterstadt

96er-Mikrotiterplatten, Greiner, Frickenhausen

ABIPrism Big Dye<sup>TM</sup> Terminator Reaction Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Adhesive PCRFilm (sealing sheet), Abbe House, Surrey (GB)

AmpliTaQ Gold DNA Polymerase (5U/µl), PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Aqua ad injectabilia, Braun, Melsungen

Aqua bidestillata, Eigenherstellung

BMA SeaKem LE-Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf

Bromphenolblau, Merck, Darmstadt

dNTPs (10 mM ) 1000µl, Eppendorf, Hamburg

EDTA (Ethylendiamintetraacetat), Sigma Aldrich, Deisenhofen

Einmalimpfeschlingen 1µl und 10µl loop, Nunc, Roskilde (DN)

Ethidiumbromid 10mg/ml, BioRad, Herkules (CA, USA)

Exonuklease I *S.aureus* 20.000 U/ml, New England Biolabs, Frankfurt

Glycerin, Merck, Darmstadt

HiDi Formamid, PE Applied Biosystems, Weiterstadt

HPLC Wasser Li Chrosoly, Merck Darmstadt

InstaGene<sup>TM</sup> Matrix, BioRad, Herkules (CA, USA)

Magnesiumchlorid Pufferlösung (25mM ), PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Molekulargewichtsstandard 1-kbp-ladder und 100-kbp-ladder (1µg/µl), Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Multiscreen 96-well Filtration Plates, Millipore, Schwallbach

Multiscreen Column Loader 45µl, Millipore, Schwallbach

Natriumchlorid 0,9%, Delta Pharm, Pfullingen

PCR Tubes 0,2ml, Biozym, Hessisch Oldendorf

Pipettenspitzen, Sarstedt, Nümbrecht

RsaI (10.000 U/ml), New England Biolabs, Frankfurt

Safe Lock Tubes (1,5 ml), Eppendorf, Hamburg

Salzsäure 32%, Merck, Darmstadt

Sephadex G50 Superfine Kunstharz, AmershamPharmaciaBiotech, Uppsala (S)

Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/µl), USB Amersham, Cleveland (OH, USA)

Tris Ultra Qualität, Roth, Karlsruhe

Trisborat-EDTA-Puffer (TBE), Roth, Karlsruhe

## **2.1.2 Laboreinrichtungen und Geräte**

Brutschrank „Funktion Line“ (Hamburg)

Flachgelelektrophoreseeinheiten Comphor Midi und Comphor L Midi, Biozym, Hessisch Oldendorf

Geldokumentationsanlage GelDoc2000, Bio-Rad-Laboratories, Segrate (I)

Gießstand PhorCaster Midi, Biozym, Hessisch Oldendorf

Heizblöcke: Blockthermostat BT 100, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden

Heizblock Grant QBT, Grant Instruments, Shepreth (GB)

Kühl- und Gefrierschränke Kirsch, Offenburg

Magnetrührer: MR 3001, Heidolph, Schwabach

IKAMAG RCT, IKA, Staufen

MR 100, Heidolph, Schwabach

Pipetten: Eppendorf, Hamburg

Power-Supply 2301 Macrodrive, LKB Bromma, Stockholm (S)

Sequencer ABI Prism 3100 Avant

Genetic Analyser 2001, PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Sicherheitswerkbänke Hera safe HS18 und HSP 18, Heraeus, Hamburg

Thermocycler t Gradient und T Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen

Vakuumzentrifuge „Speedvac“ Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg

Vortexer: REAX Top und REAX 2000, Heidloph, Schwabach

Vortex-Genie, Bendorf&Hobein AG, Zürich (CH)

Zentrifugen: Eppendorf Centrifuge 5810

Eppendorf Centrifuge 5415D

Mini Spin, Eppendorf, Hamburg

Galaxy Mini Centrifuge, Merck eurolab, Leuven (NL)

### **2.1.3 Gebrauchslösungen**

ABI Puffer: 400µl Stammlösung A (12,1g Tris, 80 µl HPLC Wasser, 32% HCl auf pH

9 (ca.1,5ml)), ad 100ml HPLC Wasser, autoklaviert

10µl Stammlösung B (20,3 mg MgCl<sub>2</sub> in 100ml HPLC Wasser) 590 µl HPLC

Wasser

Ethidiumbromidbad: 1 L Aqua bidestillata, 50µl Ethidiumbromid (10mg/ml)

Probenpuffer (Gelelektrophorese): 125mg Bromphenolblau, 17 ml Glycerin, 33 ml Aqua

Bidestillata

TBE-Puffer 0,5x: 950 ml Aqua bidestillata, 50ml 10x TBE-Puffer

TE-Puffer: 121,44 mg Tris, 3,72 mg EDTA, 100 ml HPLC Wasser, 32% HCl auf pH 7,5

(ca. 80µl)

## 2.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 2: Synthetische Oligonukleotide		
Locus	Primer	Sequenz
<i>arc C</i>	arcC-165f	5'-TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC-3'
	arcC-692r	5'- AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG- 3'
<i>aro E</i>	aroE-38f	5'- ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC- 3'
	aroE-529f	5'- GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC- 3'
<i>glp F</i>	glpF-46f	5'- CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C- 3'
	glpF-578f	5'- TGG TAA AAT CGC ATG TGC AAT TC- 3'
<i>gmk</i>	gmk-46f	5'- ATC GTT TTA TCA GGA CCA TCT G- 3'
	gmk-490r	5'- TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA- 3'
<i>pta</i>	pta-71f	5'- GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG- 3'
	pta-601r	5'- GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA- 3'
<i>tpi</i>	tpi-306f	5'- TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA- 3'
	tpi736r	5'- TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC- 3'
<i>yqiL</i>	yqiL-45f	5'-CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC- 3'
	yqiL-598r	5'-CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC- 3'

## 2.1.5 Nährmedien

Columbia-Agar mit Schafblut Plus: Oxoid GmbH, Wesel

MRSA-Select:Bio-Rad, Marnes-la-Coquette (Frankreich)

Enschede-Bouillon: Herstellung im Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Enschede, Niederlande; Pepton-Mannitol-Bouillon mit 1 mg/ml Ceftizoxime und 5 mg/ml Aztreonam

## 2.1.6 Software

PCR-Dokumentation: Quantity One 1-D-Analysis Software, BioRad, Herkules (CA, USA)

Oligonukleotidauswahl: Primer Select Power Macintosh 3.04a und Edir Seq, DANN Star,  
Madison (WI, USA)

Fast PCR © 1998-2004 v.3.3 R.Kalendar

[http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1\\_html/fastpcr.htm](http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/fastpcr.htm)

Sequenzanalyse: RidomTraceEdit-1.0 Ridom GmbH, Würzburg, <http://www.ridom.de>

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Patientengut**

Für diese Studie wurden insgesamt 833 Abstriche von 207 Patienten im Jahr 2007 in der Dermatologie des Universitätsklinikum Münster abgenommen. Eine Tabelle mit den erfassten Risikofaktoren findet sich im Anhang, wobei jeder Studienteilnehmer mindestens eines der aufgeführten Kriterien aufweisen musste (siehe Anhang).

Ein erneuter Abstrich bei dem gleichen Patienten konnte nach mindestens sechs Wochen gemacht werden. Bei MRSA-positiven Befunden wurde bei jeder Wiederaufnahme der Person ein Abstrich durchgeführt.

### **2.2.2 Bakterienanzucht**

Nach Abnahme des Abstrichs, bei dem mindestens  $10^3$  Bakterien gewonnen werden, wurde der Tupfer in ein geeignetes Transportmedium gebracht und auf Columbia-Blut- und auf MRSA-Select-Agarplatten ausgestrichen. Daraufhin folgte eine 48-stündige Bebrütung bei  $37^\circ\text{C}$ , wobei nach 24 h die erste Beurteilung von etwaigen Kolonien stattfand. Zeigte sich ein Wachstum von *S. aureus* wurde ein Pastorex Staph-Plus-Test durchgeführt, um dies zu verifizieren.

Die Abstrichtupfer wurden nach Bestreichen der Agarplatten in die Enschede-Bouillon gegeben, um die Bakterien zu inkubieren. Die angereicherte Bouillon wurde dann für die PCR-Testverfahren verwendet.

### **2.2.3 Amplifikation und Detektion**

Der genotypische MRSA-Nachweis erfolgte mithilfe der Real-Time PCR nach Huletsky, bei der MRSA direkt von nicht sterilen klinischen Proben, die eine Mischung von

Staphylokokkenarten enthalten, in weniger als einer Stunde ermittelt werden kann [48]. Um den genotypischen Nachweis der MSSA durchzuführen, wurde die PCR-basierte Untersuchung nach Martineau durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden Staphylokokken im Genstadium durch „targeting“ des *tuf* Gens detektiert. Dieses Gen kodiert für den Elongationsfaktor Tu. Somit ist es mittels der Martineau PCR-Untersuchung möglich, sowohl Gensequenzen von Staphylokokken, als auch von Staphylokokken-Stämmen nachzuweisen (*S. aureus*, *S. epidermis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*) [51].

### **2.2.3.1 DNA-Präparation**

Das Bakterienwachstum des auf den Abstrichröhrchen befindlichen Probenmaterials fand in der Pepton-Mannitol Bouillon aus Enschede statt. Diese Bouillon stellt ein „reiches“ Nährmedium dar. Für den PCR-Ansatz wurden von dieser Suspension 5 µl verwendet.

### **2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion**

Um definierte bakterielle DNA-Abschnitte zu vervielfältigen, wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Bei dieser findet zunächst durch eine Temperaturerhöhung auf 94-96°C eine Denaturierung statt, so dass ausschließlich DNA-Einzelstränge vorliegen. Nun wird je nach Primer für etwa 30 Sekunden die Temperatur auf 55-65°C heruntergefahren, so dass diese sich komplementär an die bekannte Anfangs- und Endsequenz der DNA anlagern können. Daraufhin beginnt die DNA-Polymerase am 3' Ende des Primers bei 68-72°C mit der Elongation des Strangs. Dies dauert pro 500 Basenpaare circa 30 Sekunden. Ab Ende des zweiten Zyklus' beginnt eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Produkts, da dieses nun auch als Matrize in den weiteren Zyklen dienen kann. Für eine detaillierte Darstellung der PCR wird auf die weiterführende Literatur verwiesen [93].

Für den Reaktionsansatz der PCR wurde 1µl DNA-Extrakt in 24µl PCR-Mixtur gegeben. Die DNA-Mixtur bestand aus Oligonukleotid-Primern und –Messkontrolle, 4 µl Desoxyribonukleosid-Triphosphate, 10 mM Tris-HCL Puffer, 4,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mg Rinderserumalbumin pro ml, sowie 1,25 U Taq DNA-Polymerase kombiniert mit TaqStart-Antikörpern.

Im Thermocycler lagen dann die folgenden PCR-Bedingungen vor:

- Initiale Denaturierung bei 95°C für 3 Minuten
- 48 Zyklen bestehend aus:
  - Denaturierung bei 95°C für 5 Sekunden
  - Primerhybridisierung bei 60°C für 15 Sekunden
  - Elongation bei 72°C für 20 Sekunden

Der Real-time Nachweis der PCR-Produkte erfolgte im Smart Cycler, indem ein Fluoreszenzsignal gemessen wurde, dass von an DNA-Stränge angelagerten MBP's am Ende eines Hybridisierungszyklus abgegeben wurde.

Eine Geratkontrollprobe wurde in den PCR-Ablauf hinzugefügt, um sicherzustellen, dass es keine signifikante PCR-Inhibition bei den Untersuchungsproben gab.

Um die PCR-Produkte nun voneinander zu trennen und identifizierbar zu machen, wurde die Agarosegel-Elektrophorese verwendet, bei der die nach außen negativ geladene DNA zur Anode wandert, wobei kleinere Fragmente schneller als große wandern. Zur Anfärbung der DNA wurde Ethidiumbromid verwendet, das bei UV-Licht fluoresziert.

## **2.2.4 Sequenzierung**

Bei der DNA-Sequenzierung wird die Nukleotid-Abfolge der DNA-Sequenz bestimmt. Ziel ist es, die gewonnenen DNA-Amplifikate der Patientenabstriche mit den bekannten MRSA-Stämmen vergleichen zu können.

### **2.2.4.1 DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion wurde unter Zuhilfenahme der InstaGene™ Matrix durchgeführt. Zu Beginn wurden 5 µl der mit Bakterien versehenen Enschede-Bouillon in 500 µl HPLC-Wasser suspendiert und daraufhin für eine Minute bei 12.000 U/min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abpipettiert wurde, wurden 100 µl InstaGene™ Matrix zum Pellet hinzugefügt. Die Suspension wurde nun für 20 Minuten bei 56°C inkubiert, um die Zellverbände zu lösen und Enzyme zu inaktivieren. Es folgte eine weitere Inkubation bei 100°C für 8 Minuten und danach eine 3-minütige Zentrifugation bei 12.000 U/min. Nach dem Abpipettieren des aus gelöster DNA bestehenden Überstands konnte dieser bei -20°C eingefroren werden. Für die PCR-Durchführung kann verdünnte oder konzentrierte DNA verwendet werden.

#### **2.2.4.2 Amplifikation und Aufreinigungsverfahren**

Die Amplifikation wurde wie in 2.2.3.1 beschrieben aus der extrahierten DNA durchgeführt. Da spezifische Reaktionen von überschüssigen, einzelsträngigen Oligonukleotiden und Desoxyribonukleotiden vermieden werden mussten, wurde vor Beginn der Sequenzierung eine enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte durchgeführt. Dies wurde mithilfe der hydrolytischen Enzyme Exonuklease I (EXO I) und der Shrimp Alkalischen Phosphatase (SAP) erreicht. Hierfür wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl der Exonuklease I und 1 µl der Shrimp Alkalischen Phosphatase für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und im Anschluss 15 Minuten bei 80°C. Hierdurch kam es zu einer Inaktivierung der Enzyme [122].

#### **2.2.4.3 DNA- Sequenzierung**

Die Sequenzierung erfolgte nach der Methode nach Sanger [104], bei der es zur Denaturierung, zum Annealing und zur Elongation der zu sequenzierenden DNA kommt. Bei dieser Methode werden 2'-3'-Dideoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt, die mit verschiedenen Farbstoffen markiert sind und vom automatischen Sequenzierer (Ridom StaphType) gemessen werden. Bei Einbau eines ddNTPs anstelle eines dNTPs kommt es zum Abbruch des verlängerten Strangs, da die Taq-Polymerase aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am dritten Kohlenstoffatom der Ribose die Kette nicht weiter elongieren kann. Somit entstehen unterschiedlich lange DNA-Moleküle, deren Länge spezifische Informationen über die Position der jeweiligen komplementären Basen liefert.

Der Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR bestand aus 2 µl aufgereinigtem PCR-Produkt, 0,5 µl Big Dye<sup>TM</sup> Premix (bestehend aus Ampli-Taq-DNA-Polymerase, dNTPs sowie farbstoffmarkierten ddNTPs), 2 µl Primer, 1,8 µl 5x ABI-Sequenzierungspuffer sowie 3,7 µl HPLC Wasser. Für den forward Primer und den reverse Primer müssen aufgrund der benötigten Einzelstränge unterschiedliche Reaktionsansätze verwendet werden.

Die Cycler-Bedingungen waren wie folgt: insgesamt 25 Zyklen, dabei wurde die Denaturierung bei 96°C für 10 Sekunden und die Elongation bei 60°C für 4 Minuten durchgeführt.

Damit im Sequenzer keine ungewünschten Signale abgegeben werden, erfolgt eine Aufreinigung des Produkts der Sequenzierungs-PCR mithilfe von Sephadex-Säulchen. Hierfür wurde Sephadex G50 Superfine Kunstharz in die Kavitäten einer MultiScreen HV Platte gegeben und 300 µl HPLC Wasser dazugegeben. Nachdem das Harz für drei Stunden

bei Raumtemperatur gequollen ist, wurde das überschüssige Wasser für 5 Minuten bei 2.300 U/min abzentrifugiert. Die Säulen wurden nun mit 150 µl HPLC Wasser gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 2.300 U/min zentrifugiert. Danach wurden 10 µl des Sequenzierungs-PCR-Produktes auf die Säulen aufgetragen und wiederum 5 Minuten bei 2.300 U/min zentrifugiert. Um die genaue DNA-Sequenz ermitteln zu können, wurde das Produkt nun für 20 Minuten in einer Vakuumzentrifuge bei 45°C getrocknet und anschließend mit 20 µl Formamid vermengt und nun in ein automatisches Sequenziergerät gegeben.

#### **2.2.4.4. Sequenzanalyse**

##### **Ridom StaphType Software:**

Zur Durchführung der *spa*-Typisierung wurde die StaphType Software der Firma Ridom verwendet (Ridom GmbH). Diese Software enthält die drei Hauptbereiche: Datenbank, Sequenzbearbeiter und Befunderzeuger. Im praktischen Ablauf werden die Eingangsdaten bereitgestellt, und mittels der Software wird jeder aufgerufenen Base eine Eigenschaft hinzugefügt, die einer Sequenzdefekt-Wahrscheinlichkeit entspricht.

Die Software ermittelt den *spa*-Typ, indem es Sequenzübereinstimmungen unter Berücksichtigung des Qualitätswerts erkennt. Somit ist in über 90% keine weitere manuelle Bearbeitung erforderlich. Ist diese jedoch notwendig, kann ein wandlungsfähiger, graphischer Programmieradapter benutzt werden, der eine manuelle Bearbeitung mithilfe eines integrierten Expertensystems durchführt. Um den *spa*-Typ zu ermitteln, wird nur die Information aus dem Repetierbereich genutzt. Zur Sicherstellung, dass kein führendes oder endendes Repeat fehlt, ermittelt das Programm zusätzlich die 5'- und 3'-Ende-Sequenzen in der korrekten Distanz. Die Ergebnisse der *spa*-Typisierung sowie weitere epidemiologisch relevante Daten können nach Beendigung der Sequenzbearbeitung in einem relationalem Datenbanksystem gespeichert werden und mithilfe der Boole-Funktion in tab-delimited spreadsheet Format erneuert und exponiert werden. Zur Verhinderung von Datenverlusten und zur Inhaltssicherung wird die Integrität der Datenbank regelmäßig kontrolliert und inhaltlich aus Datenschutzgründen kryptographisch gesichert. Des Weiteren können unterschiedliche konfigurierbare Berichte erstellt werden.

Zur Sicherstellung einer einheitlichen Terminologie verwendet der Ridom StaphType numerische *spa* repeats und Typ-Kodierungen, die von der Software synchronisiert werden. Es können neue *spa* repeats und Typen mit gleichen Qualitätskriterien während der Synchronisierung auf den Server übertragen werden, damit ihnen eine endgültige

Kennzeichnung zugeteilt werden kann. Hierfür werden die *spa*-Typen und die repeats, die von weiteren Benutzern seit der letzten Synchronisierung entdeckt wurden, in die Kundensoftware übertragen. Darüber hinaus können auch lokale *spa*-Typ-Frequenzen auf den Server übermittelt werden, wobei der Server globale Frequenzdateien zurückgibt.

Der Zugriff auf die Website ist uneingeschränkt möglich und es können *spa* repeat-Sequenzen (FASTA format) und *spa*-Typen heruntergeladen werden [44]. Auch Personen, die nicht mit dem Ridom StaphType arbeiten, können durch Eingaben über Chromatogramme und über neue *spa* repeats ebenfalls auf diese Terminologie zugreifen [51].

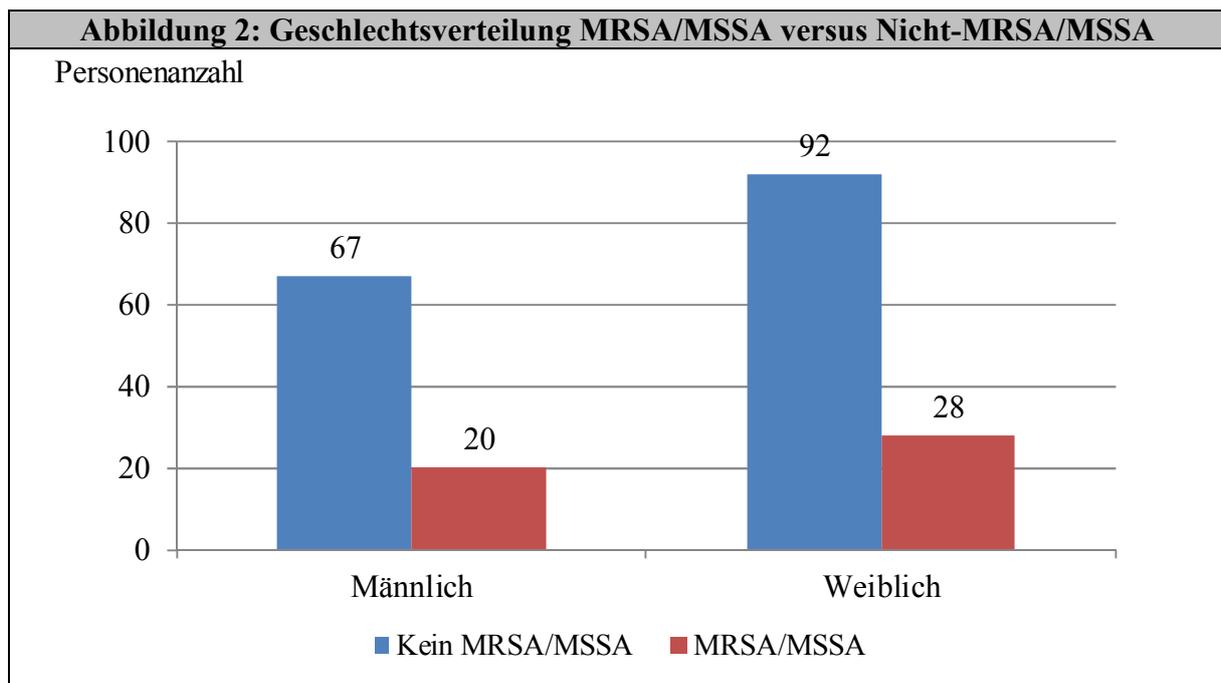
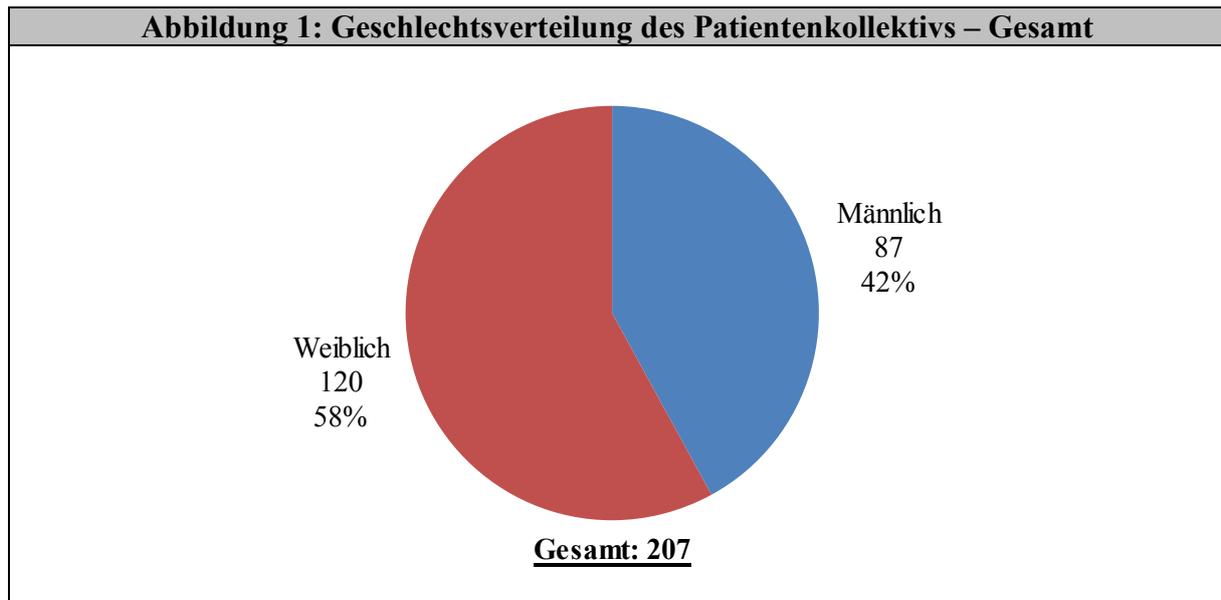
### 3 ERGEBNISSE

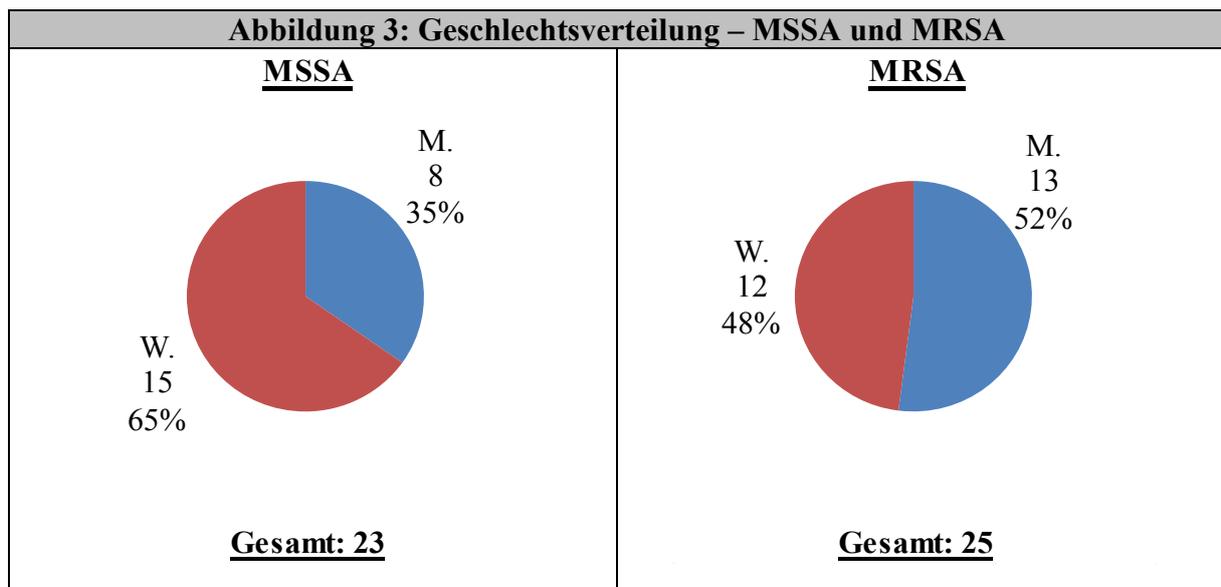
#### 3.1 Epidemiologie

##### 3.1.1 Geschlechtsverteilung

Im Jahr 2007 wurden insgesamt 833 Abstriche von 207 Patienten abgenommen.

Von den 207 Patienten waren 120 weiblich (58%) und 87 männlich (42%) (Abbildung 1).





Von 23 MSSA-Fällen waren 15 Patienten weiblich (65%) und acht männlich (35%).

13 der 25 MRSA-positiven Personen waren männlich (52%) und 12 weiblich (48%).

Insgesamt waren somit häufiger Frauen betroffen und dies spiegelt sich in den MSSA-Fällen wider. Allerdings waren bei MRSA mehr Männer als Frauen betroffen.

**Tabelle 3: Geschlechtsverteilung hinsichtlich des *spa*-Typs**

<i>spa</i> -Typ	Männlich	Weiblich	Gesamt
t001	1	0	1
t002	1	1	2
t003	1	3	4
t004	2	2	4
t008	0	4	4
t009	0	1	1
t011	0	2	2
t012	1	1	2
t026	0	1	1
t032	8	3	11
t068	0	1	1
t078	1	0	1
t084	1	1	2
t091	0	3	3
t159	1	1	2
t232	1	0	1
t458	0	1	1
t469	0	1	1
t764	0	1	1
t2115	1	0	1
t2242	0	1	1
t3273	1	0	1
<b>Gesamt</b>	<b>20</b>	<b>28</b>	<b>48</b>

Der *spa*-Typ t008 wurde vier Mal nachgewiesen und dies jedes Mal bei einer weiblichen Person.

Von insgesamt 11 positiven Abstrichen wurde der *spa*-Typ t032 in acht dieser Fälle bei einem Mann nachgewiesen.

Der *spa*-Typ t091 konnte drei Mal festgestellt werden, wobei dies in allen Fällen bei einer Frau war.

### 3.1.2 *spa*-Typ-Verteilung

Die Inzidenz von MRSA in dieser Studie liegt bei 12,1%, die von MSSA bei 11,1%. Bei den Patienten, bei denen *S. aureus* oder MRSA nachgewiesen wurde, wurde eine *spa*-Typisierung durchgeführt (Tabelle 4).

**Tabelle 4: spa-Typ-Verteilung in der Dermatologie Münster**

spaTyp	Häufigkeit	
Cluster 1 <i>t001</i> <i>t002</i>	2	 9,09%
Cluster 2 <i>t008</i> <i>t068</i>	2	 9,09%
Cluster 3 <i>t091</i> <i>t3272</i>	2	 9,09%
Cluster 4 <i>t078</i> <i>t2242</i>	2	 9,09%
Singletons <i>t003</i> <i>t004</i> <i>t009</i> <i>t011</i> <i>t012</i> <i>t032</i> <i>t084</i> <i>t159</i> <i>t469</i> <i>t764</i> <i>t2115</i>	11	 50,00%
Excluded spa-Types <i>t026</i> <i>t232</i> <i>t458</i>	3	 13,64%
<b>Gesamt</b>	<b>22</b>	

Der am häufigsten nachgewiesene *spa*-Typ ist der t032, gefolgt von den Typen t003, t004 und t008. Nur ein Mal vorkommend waren die *spa*-Typen t001, t009, t026, t068, t078, t2115, t2242, t232, t3273, t458, t469 und t764.

### 3.1.3 *spa*-Typ versus Methicillin-Resistenz und -Sensitivität

48 der 207 Personen, die für diese Studie untersucht wurden, zeigten zu mindestens einem Zeitpunkt eine Kolonisation/ Infektion mit MSSA oder MRSA. Die Häufigkeiten und der Bezug zu den *spa*-Typen werden in Tabelle 5 dargestellt.

<b>Tabelle 5: MRSA- und MSSA-Häufigkeiten hinsichtlich des <i>spa</i>-Typs</b>		
<u>Spa-Typ</u>	<u>MRSA (absolut)</u>	<u>MSSA (absolut)</u>
t001	1	0
t002	0	2
t003	3	1
t004	4	0
t008	3	1
t009	0	1
t011	2	0
t012	0	2
t026	0	1
t032	11	0
t068	1	0
t078	0	1
t084	0	2
t091	0	3
t159	0	2
t232	0	1
t458	0	1
t469	0	1
t764	0	1
t2115	0	1
t2242	0	1
t3272	0	1
<b>Gesamt</b>	<b>25</b>	<b>23</b>

Bis auf zwei Ausnahmen wurde bei allen *spa*-Typen entweder ausschließlich MRSA oder MSSA nachgewiesen. Nur bei dem t003 und dem t008 konnten sowohl MRSA, als auch MSSA ermittelt werden.

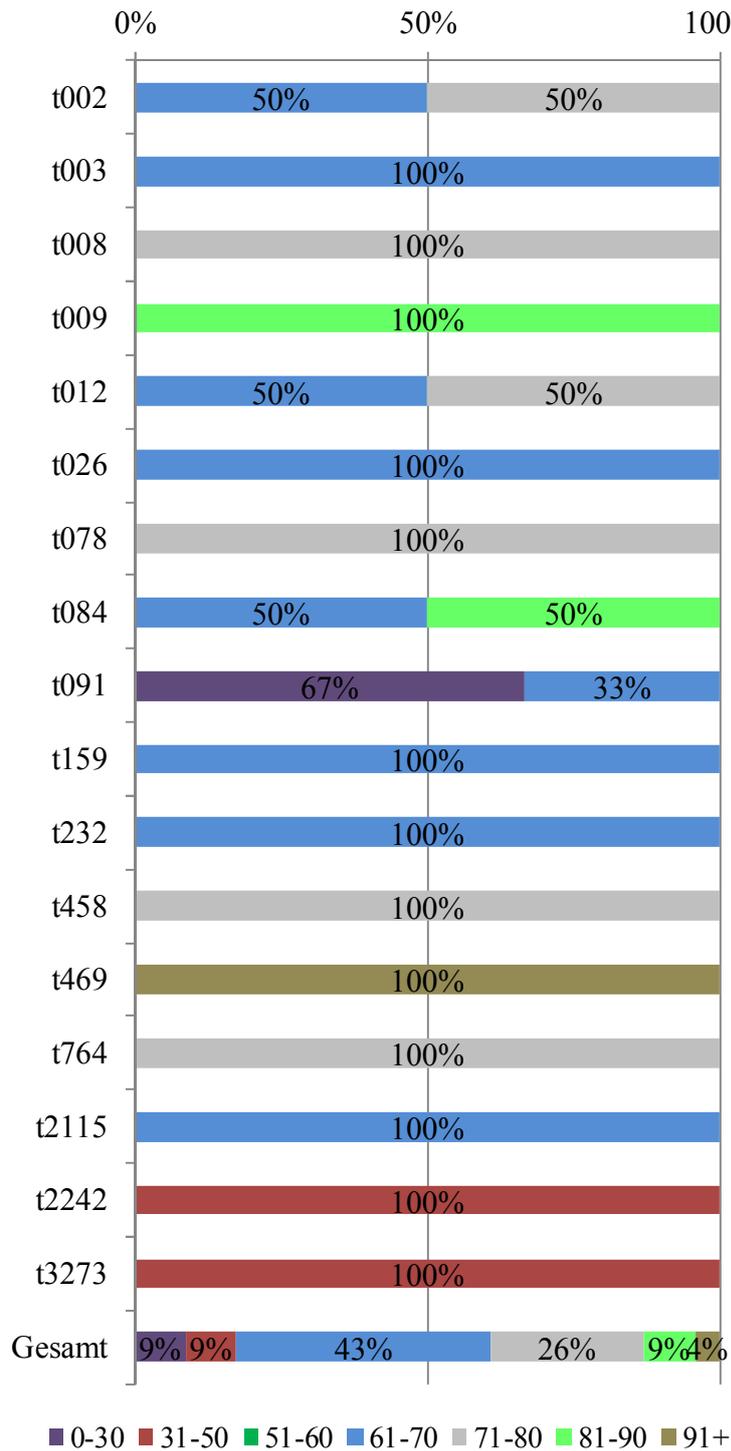
### **3.1.4 Patientenalter versus *spa*-Typ**

Das Durchschnittsalter der MRSA- und MSSA-positiven Patienten in dieser Studie betrug 62,8 Jahre. Die jüngste positiv getestete Person war 17, die älteste 92 Jahre alt. 79,2% dieser Personen waren über 50 Jahre alt.

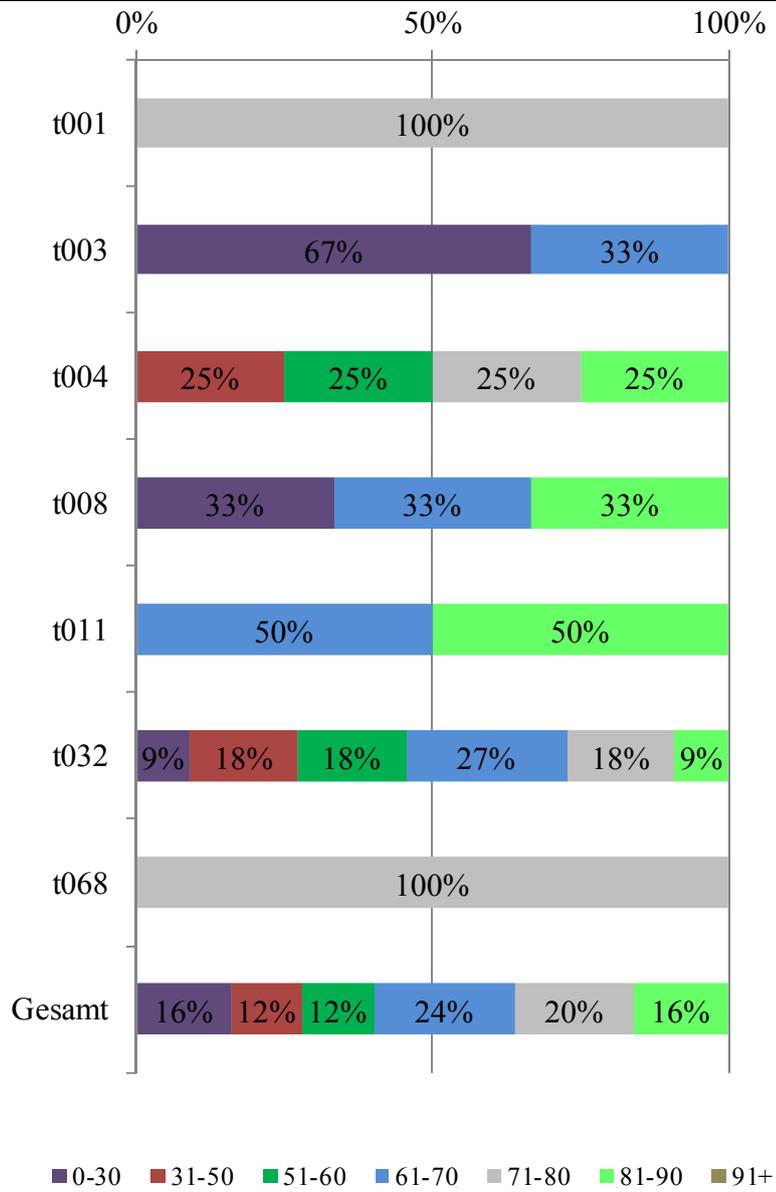
Bei den 23 MSSA-positiven Patienten war der jüngste Patient 19 und der älteste 92 Jahre alt. Das Durchschnittsalter lag bei 65,7 Jahren.

Die Personen, bei denen MRSA nachgewiesen werden konnte, zeigten eine Altersspanne von 17 bis 86 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 60,2 Jahren.

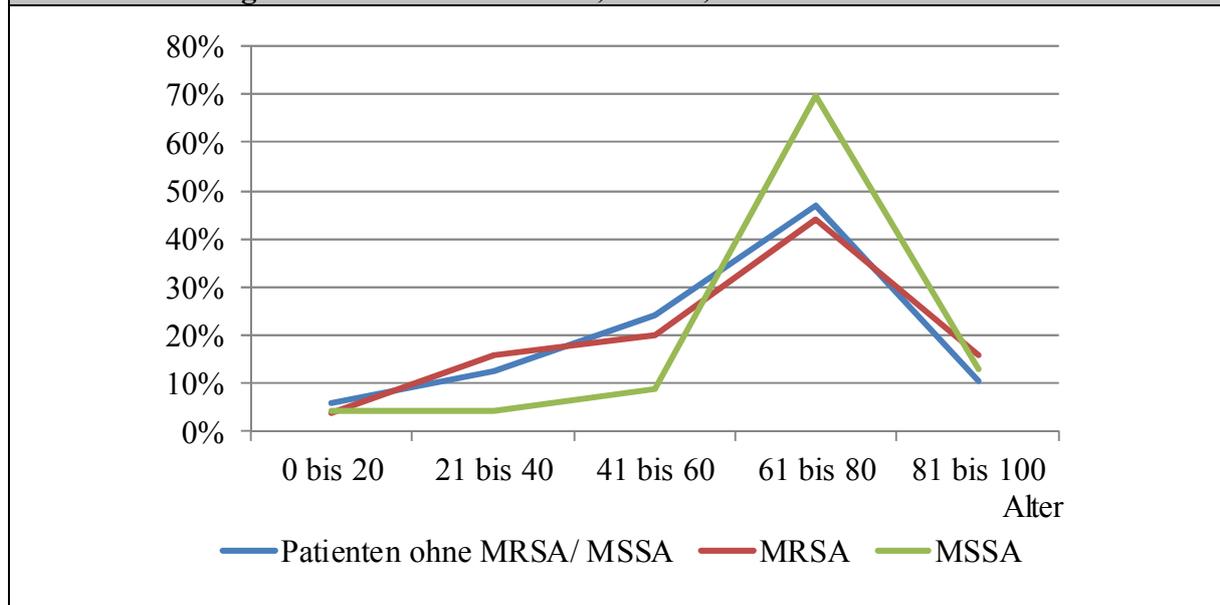
**Abbildung 4: Patientenalter in Bezug zum MSSA-*spa*-Typ**



**Abbildung 5: Patientenalter in Bezug zum MRSA-*spa*-Typ**



**Abbildung 6: Patientenalter MRSA, MSSA, Patienten ohne MRSA/MSSA**



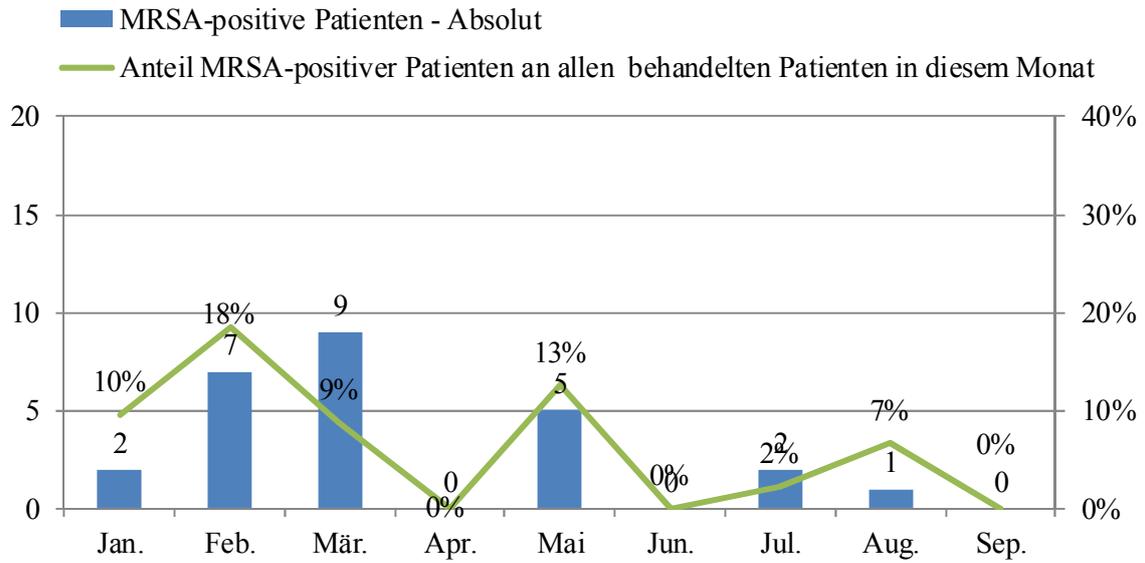
Das häufigste Auftreten war sowohl von MRSA als auch von MSSA in der Altersklasse 61-70 Jahre zu verzeichnen (24 bzw. 43%), gefolgt von Personen im Alter von 71-80 Jahren (20 bzw. 26%). Somit machen die Patienten von 61-80 Jahren einen Anteil von 56% der betroffenen Personen in dieser Studie aus. Der am häufigsten vorkommende *spa*-Typ t032 tritt bis auf in der höchsten in allen Altersgruppen auf. Da zwölf der gefundenen *spa*-Typen nur ein Mal gefunden wurden, lässt sich daraus keine Altersbevorzugung erkennen, jedoch fällt auf, dass sowohl der t2242 als auch der t3273 bei jüngeren Patienten aufgetreten sind.

## 3.2 *spa*-Typen

### 3.2.1 Erstauftreten der *spa*-Typen

Es wurden im gesamten Zeitraum 25 MRSA- und 23 MSSA-positive Abstriche gewonnen. Der zeitliche Rahmen ist in Abbildung 7 für MRSA und in Abbildung 8 für MSSA dargestellt.

**Abbildung 7: Zeiträume des ersten Auftretens von MRSA**

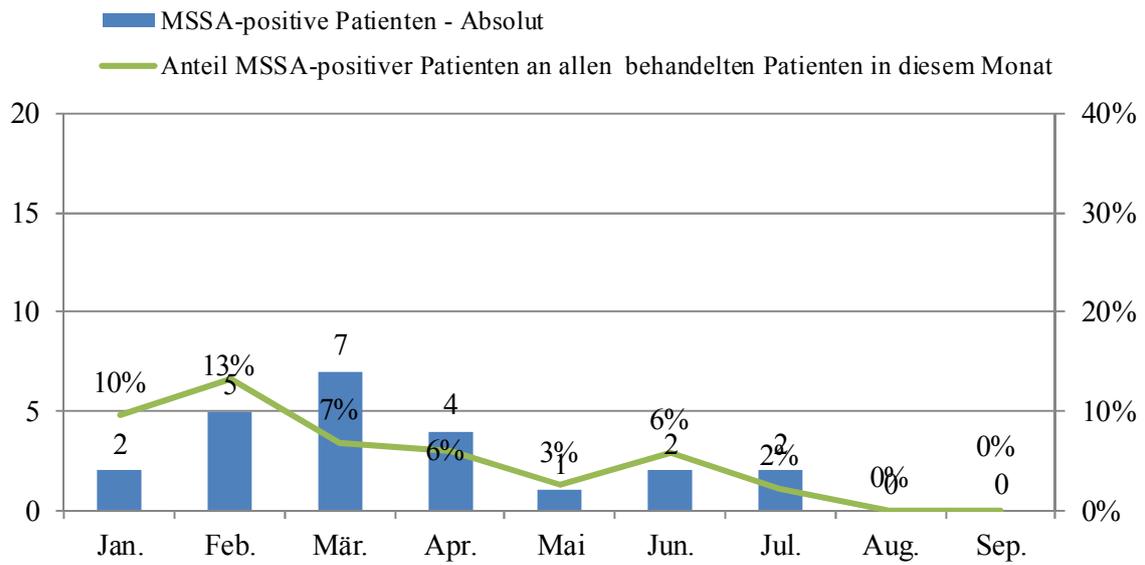


Vorkommen nach spa -Typ

t001						1
t002						
t003		1	1		1	1
t004		4				
t008	1	1	1			
t009						
t011				3		
t012						
t026						
t032	1	1	6		1	1
t068			1			
t078						
t084						
t091						
t159						
t232						
t458						
t469						
t764						
t2115						
t2242						
t3273						

Erhöhtes Vorkommen

**Abbildung 8: Zeiträume des ersten Auftretens von MSSA**



Vorkommen nach spa -Typ

t001					
t002		1	1		
t003				1	
t004					
t008			1		
t009	1				
t011					
t012	1		1		
t026				1	
t032					
t068					
t078					1
t084			1	1	
t091		1		1	1
t159		1	1		
t232					1
t458			1		
t469			1		
t764		1			
t2115				1	
t2242		1			
t3273				1	

Erhöhtes Vorkommen

An folgenden Tagen wurde mehr als ein positiver MRSA-Abstrich gewonnen, bei dem derselbe *spa*-Typ identifiziert wurde:

- 27.02.2007: Nachweis von t004 bei vier Patienten
- 23.05.2007: Nachweis von t011 bei zwei Patienten (und zusätzlich einer Person mit t032)
- 13.03.2007: Nachweis von t032 bei fünf Patienten.

Der *spa*-Typ t003, der insgesamt vier Mal nachgewiesen wurde, wurde immer zu einem anderen Zeitpunkt festgestellt.

### **3.2.2 Tragedauer der *spa*-Typen**

Im Laufe des Abnahmezeitraums konnten 48 positive Abstriche gewonnen werden. In 39 der 48 Fälle fiel der Keimnachweis nur zu einem Zeitpunkt positiv aus. Bei neun Personen wurde das Bakterium mindestens ein weiteres Mal bestätigt. Die durchschnittliche Tragedauer betrug 10,46 Tage.

Abbildung 9: spa-Typ hinsichtlich Patientenzahl und Tragedauer - MRSA

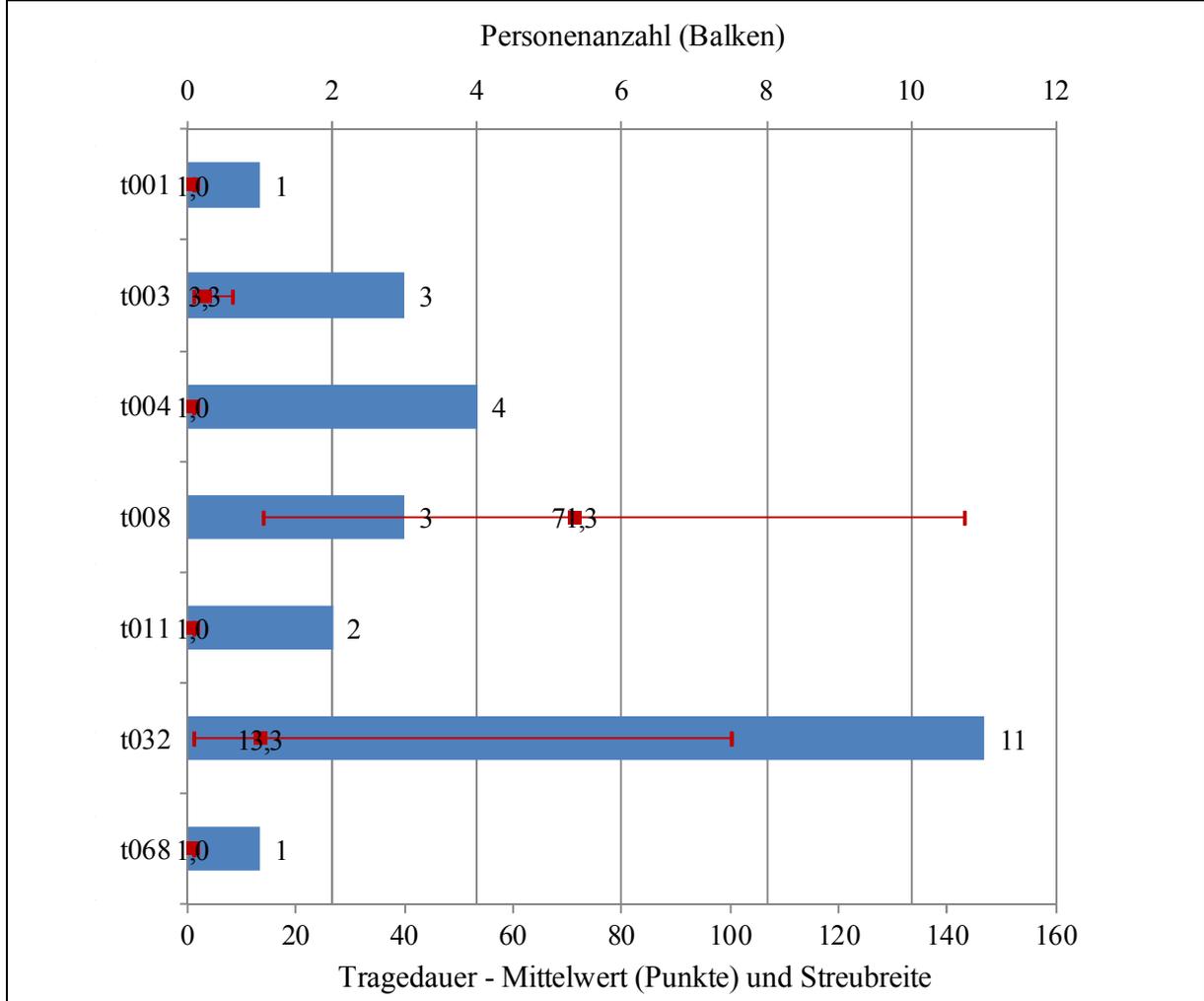
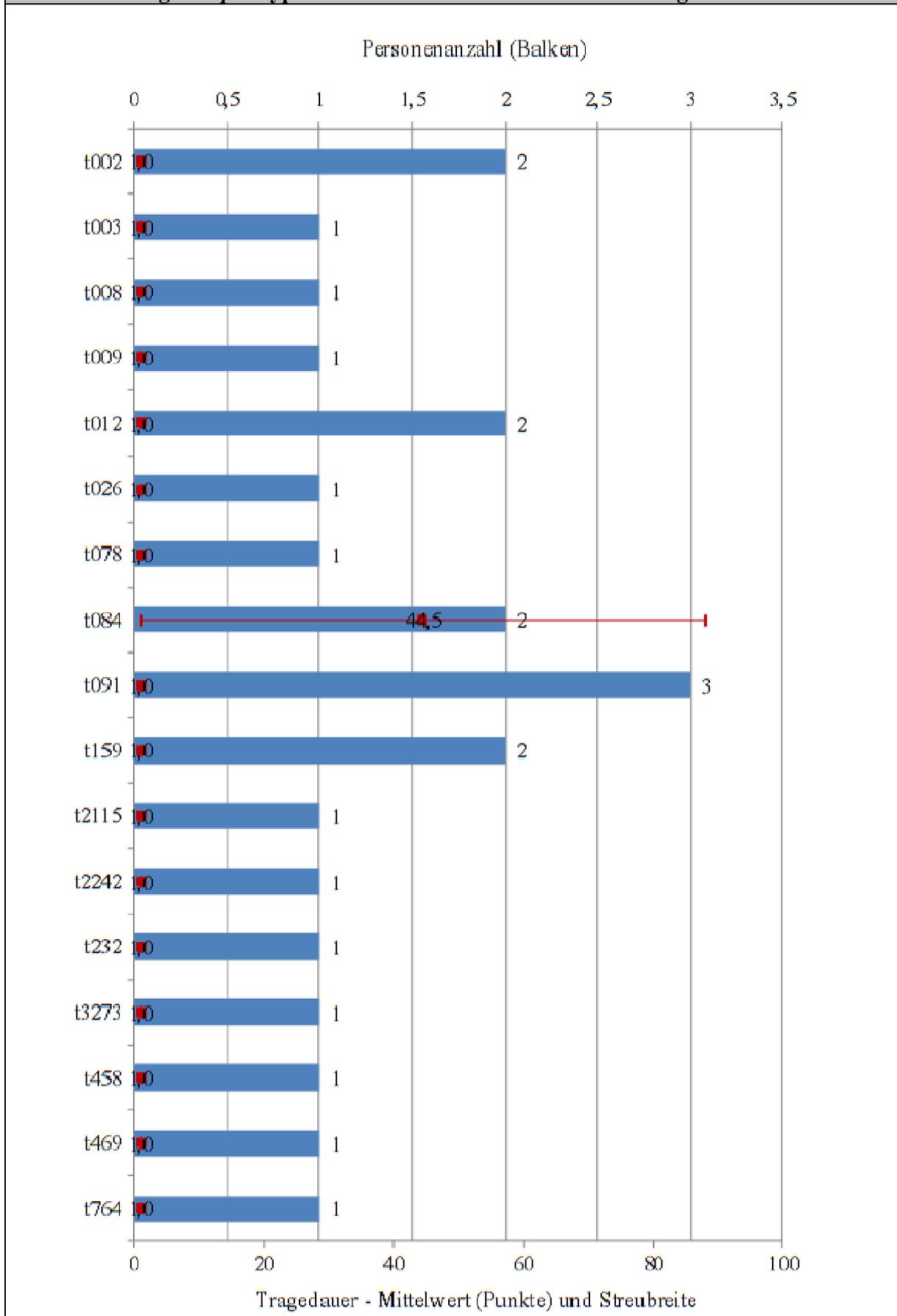
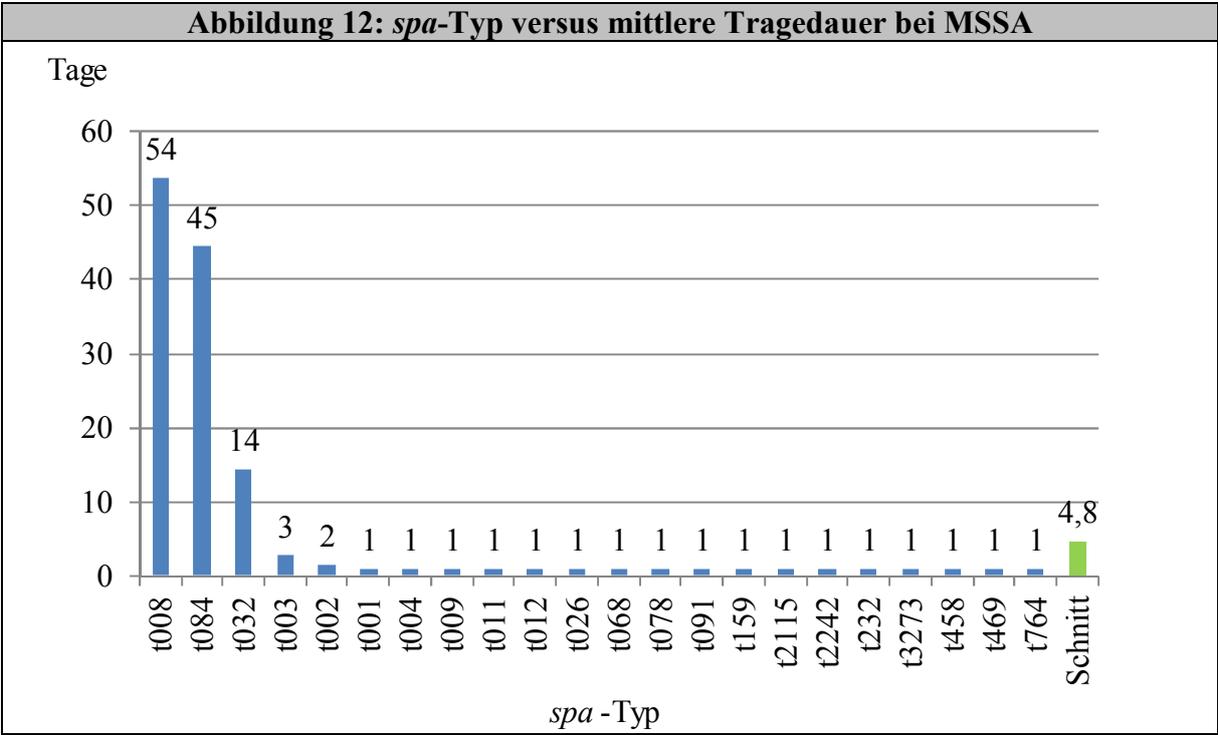
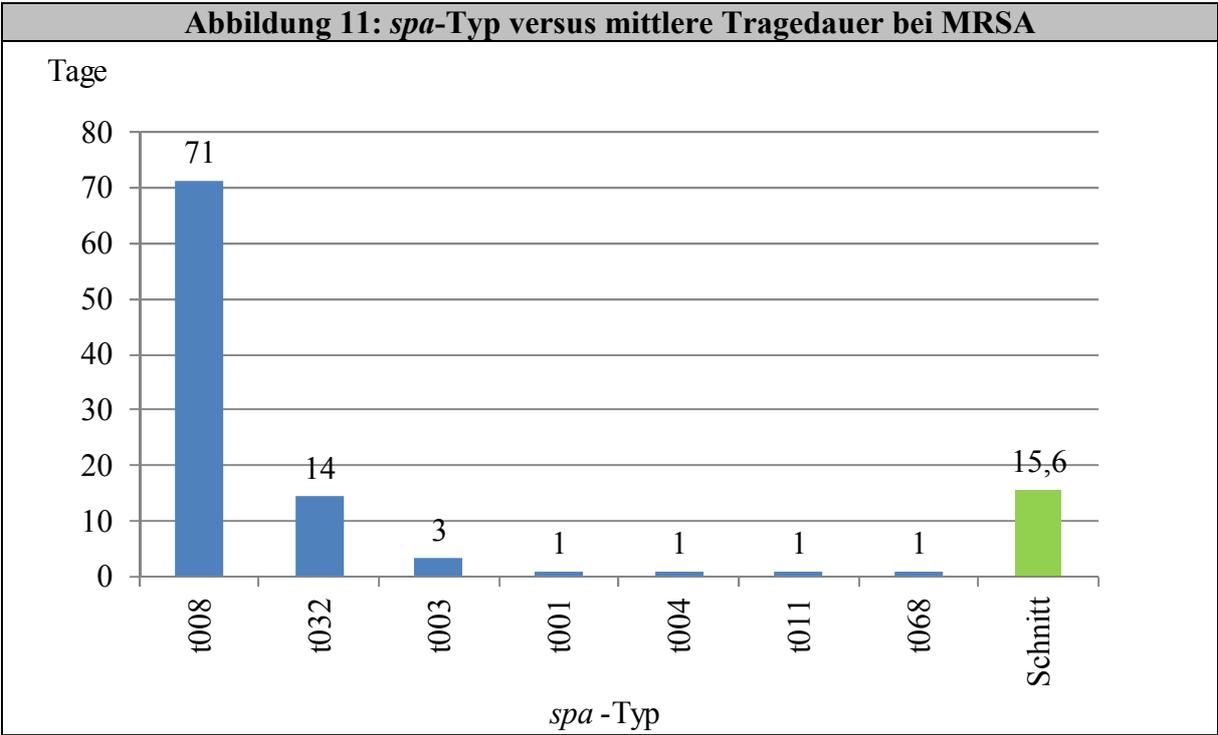


Abbildung 10: *spa*-Typ hinsichtlich Patientenzahl und Tragedauer - MSSA





Die Durchschnittstragedauer pro Person von MRSA beträgt 15,6 Tage, die von MSSA 4,8 Tage.

In 39 der 48 Fälle (81,3%) wurde das Bakterium nur zu einem Zeitpunkt nachgewiesen. In zwei weiteren Fällen war der Abstrich über zwei Tage positiv (bei t002 und t032). Die längste Tragedauer zeigte ein Patient, der von dem *spa*-Typ t008 (MRSA) besiedelt war; hier konnte das Bakterium 143 Tage nachgewiesen werden.

Von den insgesamt 22 festgestellten *spa*-Typen wurden sechs Typen über einen längeren Zeitraum nachgewiesen: zwischen 2 Tagen (u.a. t002) und 143 Tagen (t008). Bei dem *spa*-Typ t008 wurde bei drei von vier Patienten eine längeren Tragedauern nachgewiesen (14 Tage, 57 Tage und 143 Tage) und die Besiedlung wurde dabei immer durch MRSA verursacht. Nur bei dem Patient, bei dem die Tragedauer einen Tag betrug, wurde MSSA nachgewiesen.

Der *spa*-Typ 032 wurde insgesamt 11 Mal festgestellt und davon wurde jedes Mal MRSA nachgewiesen. Bei acht dieser Personen wurde er nur ein Mal (72,7%) nachgewiesen; bei drei der Personen wurde er über eine längere Dauer nachgewiesen (2 Tage, 49 Tage, 100 Tage).

Zwei Mal konnte der *spa*-Typ t084 (beide MSSA) nachgewiesen werden. Bei einem dieser Patienten wurde er nur zu einem Zeitpunkt festgestellt, bei der anderen Person wurde der t084 über 88 Tage nachgewiesen.

Der t004 (immer MRSA) wurde bei vier Patienten festgestellt. Dabei wurde er bei allen Patienten nur ein Mal nachgewiesen.

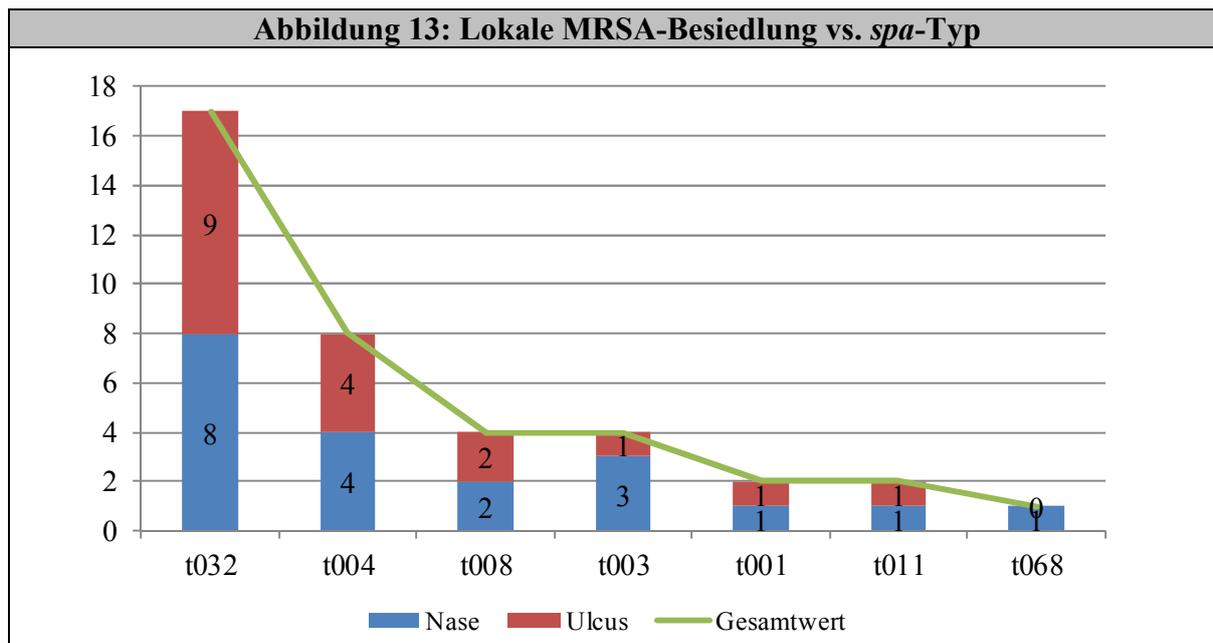
### **3.2.3 Lokale Besiedlung der *spa*-Typen**

Es wurden 25 MRSA und 23 MSSA nachgewiesen. Bei 18 von den 48 Personen kam es zu einer Doppelbesiedlung, so war in 13 Fällen sowohl das Ulcus, als auch die Nase von MRSA kolonisiert.

Mit dem Hintergrund der Doppelbesiedlung war die Kolonisation wie folgt:

MSSA:       Nase: 18 Personen  
              Ulcus: 10 Personen

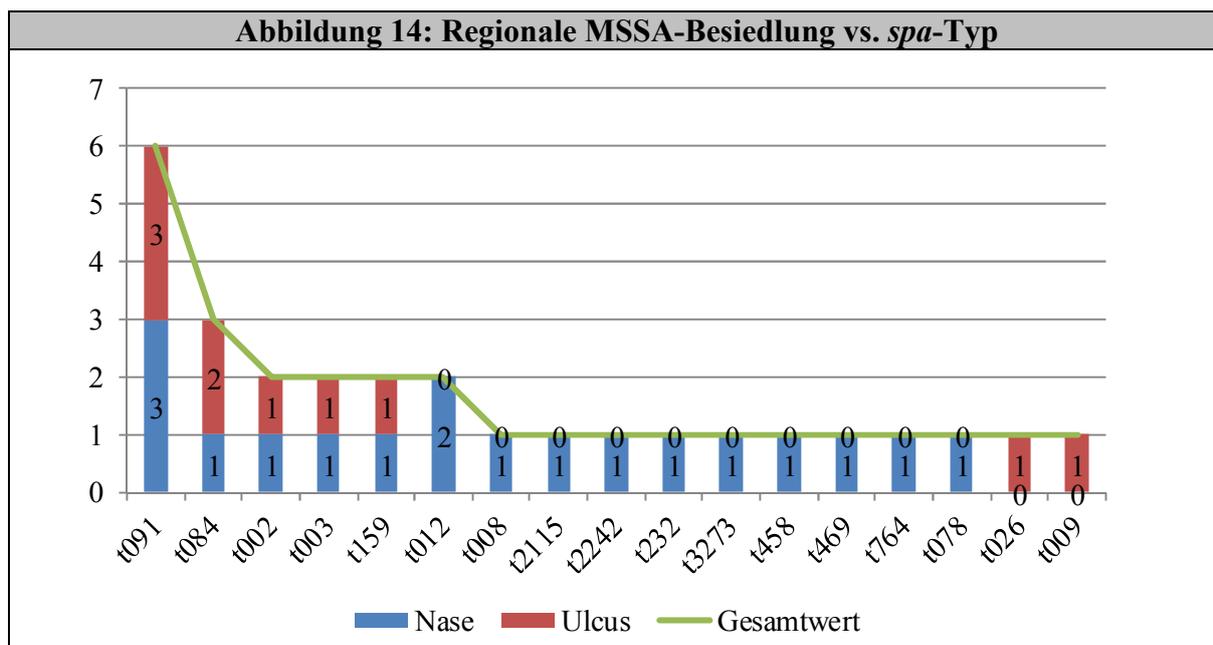
MRSA:       Nase: 20 Personen  
              Ulcus: 18 Personen



MRSA Nase: Bei acht der 20 Patienten (40%), bei denen eine MRSA-Kolonisation der Nase festgestellt wurde, konnte der *spa*-Typ t032 nachgewiesen werden. Bei weiteren vier Personen (20%) handelte es sich um den *spa*-Typ t004.

MRSA Ulcus: In neun der 18 positiven MRSA-Abstriche (50%) von Ulcera wurde der *spa*-Typ t032 nachgewiesen. In weiteren vier Proben (22%) handelte es sich um den *spa*-Typ t004.

Der  $\chi^2$ -Test bezüglich der Signifikanz, dass MRSA mit einer Infektion assoziiert ist, ergab einen Wert von 4,009 mit einem Freiheitsgrad (P-Wert 0,0226). Damit ist MRSA signifikant mit einer Infektion assoziiert.



MSSA Nase: Bei drei der 18 Patienten (17%) wurde der *spa*-Typ t091, bei zwei der 18 Patienten (11%) der *spa*-Typ t012 nachgewiesen.

MSSA Ulcus: Bei drei der zehn Personen (30%), bei denen eine MSSA-Besiedlung des Ulcus nachgewiesen wurde, handelte es sich um den *spa*-Typ t091.

### 3.2.4 *spa*-Typ versus Risikofaktoren

171 der 207 untersuchten Patienten litten an einem Ulcus cruris oder einer offenen chronischen Wunde. Bei 39 Personen (81%) mit MRSA/ MSSA wurde eine chronischen offenen Wunde/ Ulcus nachgewiesen. Der zweit häufigste Risikofaktor war eine Antibiotikaeinnahme innerhalb der letzten sechs Monate: dies war bei 54% der 48 betroffenen Patienten der Fall. Die weiteren Risikofaktoren waren in absteigender Reihenfolge: Krankenhausaufenthalt (>24h) innerhalb der letzten sechs Monate (bei 48% der Patienten), MRSA-Anamnese (bei 31%) Immunsuppression (bei 19%), Akne inversa (bei 8%), Chronisches Ekzem/ Atopische Dermatitis (bei 8%) und Kontakt zu einem MRSA-Träger (bei 2%).

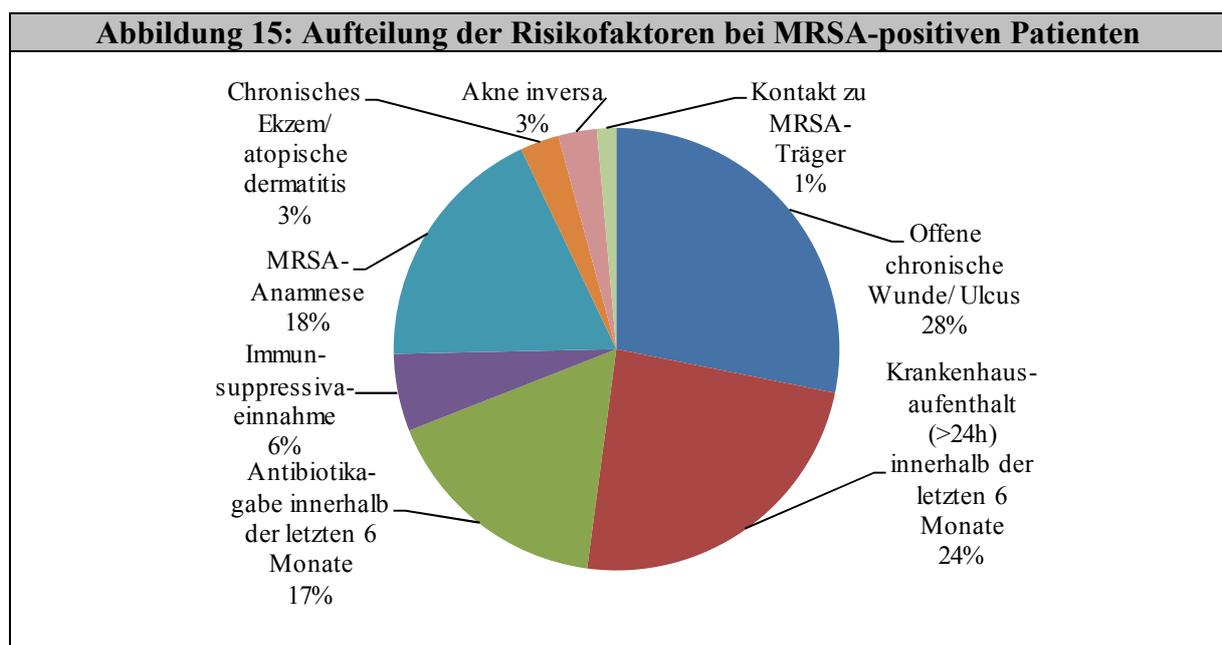
Bei einer Person, die Kontakt zu einem MRSA-Träger hatte, wurde der t032 nachgewiesen. Dieser *spa*-Typ wurde ebenfalls bei dem MRSA-Träger festgestellt, zu dem der Kontakt bestand.

Der t032 wurde insgesamt elf Mal nachgewiesen und davon hatten acht Personen (73%) eine chronische offene Wunde/ Ulcus, neun Personen berichteten über einen Krankenhausaufenthalt und sieben Personen von einer Antibiotikaeinnahme innerhalb von sechs Monaten, fünf Personen hatten MRSA bereits früher ein Mal gehabt und je eine Person nahm Immunsuppressiva, hatte Kontakt zu einem MRSA-Träger oder litt an Akne inversa.

Bei dem t008 kamen häufig mehrere Risikofaktoren zusammen (offene chronische Wunde/ Ulcus, Immunsuppression, MRSA-Anamnese, Krankenhausaufenthalt und Antibiotikaeinnahme).

Die Risikofaktoren, die sich ausschließlich auf MRSA beziehen, zeigen Tabelle 6 und Abbildung 15.

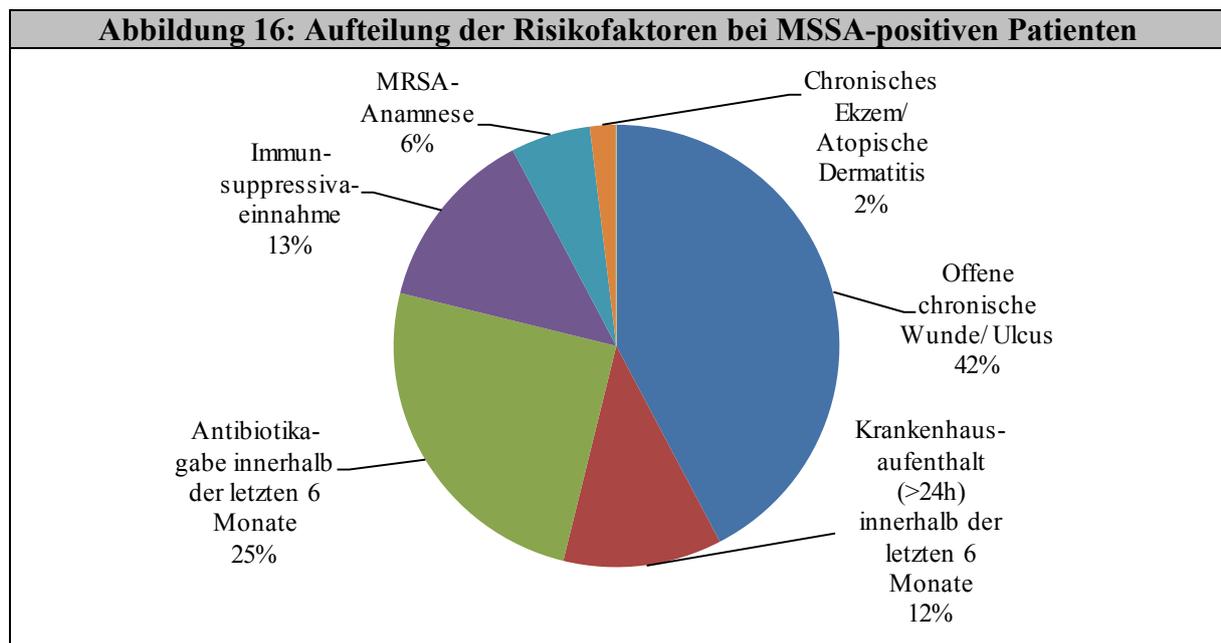
	Patientenzahl	
	MRSA positiv	MRSA negativ
Offene chronische Wunde/ Ulcus	20	151
Krankenhausaufenthalt (>24h) innerhalb der letzten 6 Monate	17	88
Antibiotikagabe innerhalb der letzten 6 Monate	12	92
Immunsuppressivaeinnahme	4	29
MRSA-Anamnese	13	19
Chronisches Ekzem/ atopische dermatitis	2	18
Rosacea	0	9
Akne inversa	2	1
Kontakt zu MRSA-Träger	1	2



Der häufigste Risikofaktor bei MRSA war eine offene chronische Wunde/ Ulcus, gefolgt von einem Krankenhausaufenthalt, einer MRSA-Anamnese und einer Antibiotikaeinnahme.

Die Risikofaktoren, die sich ausschließlich auf MSSA beziehen, zeigen Tabelle 7 und Abbildung 16.

	Personenanzahl	
	MSSA positiv	MSSA negativ
Offene chronische Wunde/ Ulcus	22	149
Krankenhausaufenthalt (>24h) innerhalb der letzten 6 Monate	6	99
Antibiotikagabe innerhalb der letzten 6 Monate	13	91
Immunsuppressivaeinnahme	7	26
MRSA-Anamnese	3	29
Chronisches Ekzem/ atopische dermatitis	1	19
Rosacea	0	9
Akne inversa	0	3
Kontakt zu MRSA-Träger	0	3



Der häufigste Risikofaktor für eine Kolonisation mit MSSA war eine offene chronische Wunde/ Ulcus, gefolgt von einer Antibiotikaeinnahme, Immunsuppression und einem Krankenhausaufenthalt.

## 4 DISKUSSION

Die Zunahme von MRSA-Infektionen ist ein weltweit stetig wachsendes Problem, da sowohl die Therapie schwierig ist, als auch die mit der Infektion verbundenen Kosten (Antibiotikatherapie, Pflege, längere Krankenhausverweildauer) von hoher Relevanz sind. Zudem haben die betroffenen Patienten eine erhöhte Mortalitäts- und Letalitätsrate [77].

*S. aureus* ist ein weltweit verbreitetes Bakterium und der häufigste Erreger von nosokomialen Infektionen wie Wundinfektionen, Sepsen, Endokarditiden, Pneumonien und Katheter-assoziierten Infektionen [90]. Innerhalb der letzten Jahrzehnte ist es zu einer globalen Ausbreitung von MRSA gekommen. In Deutschland wird mittlerweile von einem MRSA-Anteil von 20% ausgegangen [74] (im Jahre 1990 lag der Anteil bei 2%, im Jahre 2004 bei 23%, 2008 bei 19,5%) [43, 112].

Es gibt zahlreiche Gründe für die zunehmenden Resistenzen. So steigt der Selektionsdruck der Bakterien durch die nicht indizierte (z. B. bei viralen respiratorischen Infektionen), topische (z. B. bei bakteriellen Hautinfektionen), zu kurze oder unterdosierte Anwendung von Antibiotika. Auch eine mangelnde Hygiene, sowohl durch eine unzureichende Händedesinfektion, als auch durch keine oder zu kurze Isolierung der betroffenen Patienten, spielt bei der Resistenzentwicklung eine entscheidende Rolle. Des Weiteren sind die Screeningmaßnahmen häufig unzureichend, so dass kolonisierte Personen nicht ausfindig gemacht werden können. Hinzu kommt, dass die Sanierungsdauer oftmals länger als der eigentlich stationäre Krankenhausaufenthalt dauert und sich zudem der CA-MRSA weltweit zunehmend ausbreitet [81, 91, 1, 118, 53, 30]. Da sowohl die Antibiotikagabe, als auch die MRSA-Prävalenz steigt, kann ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren vermutet werden. Zu den Präventionsmaßnahmen zählt somit eine adäquate Antibiotikagabe sowohl im hausärztlichen, als auch im stationären Bereich.

In Deutschland wird bei der Patientenaufnahme in ein Krankenhaus häufig kein generelles MRSA-Screening durchgeführt, so dass ein etwaig positiver MRSA-Befund erst zufällig oder bei klinischem Verdacht auf eine Infektion nach einer gewissen Zeitspanne ermittelt werden kann. Chaberny et al. machten eine Umfrage unter Krankenhäusern, die am MRSA-Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (MRSA-KISS) teilnehmen. Dies ist ein Modul zur Infektionsprävention und bislang sind daran 300 Krankenhäuser beteiligt. Von den 134 befragten Krankenhäusern setzen alle die Empfehlungen des Robert-Koch-Instituts um und haben zudem teilweise noch weitere Präventionsmaßnahmen etabliert (z.B. ein Warnsystem zur Identifikation ehemals positiver MRSA-Patienten bei stationärer Wiederaufnahme, Verlagerung von MRSA-Patienten in die Ambulanz). Allerdings erfolgt keine 100%ige

Isolierung bei MRSA-Nachweis und ein generelles MRSA-Aufnahmescreening wurde nur von 19% der Krankenhäuser durchgeführt [11].

Um Aufschluss über Ausbreitung und Übertragung von MRSA und MSSA zu erlangen, wurde für diese Studie eine *spa*-Typisierung durchgeführt. Die molekulare Grundlage der *spa*-Typisierung ist die Sequenzanalyse eines sehr variablen Abschnitts des *S. aureus* Protein A (*spa*-) Gens. Dieser zeichnet sich durch kurze Repeats aus (21-27 Basenpaare), aus deren Kombination dann der *spa*-Typ und somit das Typisierungsergebnis resultiert [37].

Mit den vorliegenden Ergebnissen wurde die epidemiologische Seite von MRSA und MSSA bei Patienten mit offenen chronischen Wunden oder anderen Risikofaktoren dargestellt. Die ermittelten *spa*-Typen wurden hinsichtlich Erstauftreten, Tragedauer, lokaler Besiedlung, Patientenalter und -Geschlecht, Häufigkeiten und Risikofaktoren ausgewertet. Hierfür wurden MRSA- und MSSA-Isolate aus dem Nasenvorhof sowie etwaiger offener Wunden/ Ulcera untersucht, die im Jahr 2007 in der Dermatologie der Universität Münster gesammelt wurden. Von 833 Abstrichen stellten sich 48 als MRSA- bzw. MSSA-positiv heraus (25 MRSA, 23 MSSA).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine ausgeprägte klonale Heterogenität der *spa*-Typen in der Region Münster. Insgesamt wurden 22 unterschiedliche *spa*-Typen identifiziert. Die *spa*-Typisierung hilft, ein besseres Verständnis über die lokale MRSA-Epidemiologie zu gewinnen.

Die Prävalenz von MRSA in dieser Studie beträgt 12,1% und liegt damit im oberen Drittel im Vergleich mit ähnlichen Studien, wobei in der Literatur zum Teil von sehr weit auseinander reichenden MRSA-Prävalenzen berichtet wird [17, 73, 75]. Köck et al. machten in einer Studie im Jahr 2006 in 39 deutschen und einem holländischen Krankenhaus 25.540 Abstriche und stellten dabei eine MRSA-Prävalenz von 1,6% in den deutschen und 0,5% in dem holländischen Krankenhaus fest [11]. In den Jahren 2004-2006 machten Harbarth et al. eine Untersuchung an 10.193 chirurgischen Patienten in einem schweizerischen Krankenhaus und stellten dabei eine MRSA-Prävalenz von 5,1% fest [35]. Häufig sind bei Patienten mit offenen Wunden, sowie in dermatologischen Kliniken höhere Inzidenzraten anzutreffen [121,66], die MRSA-Rate insgesamt in Deutschland wird jedoch laut Robert-Koch-Institut nur in 0,5% der Fälle von dermatologischen Kliniken gemeldet (die häufigsten MRSA-Infektionen werden von internistischen und chirurgischen Stationen berichtet) [98]. Europäische MRSA-Raten sind dabei häufig geringer als die Raten in den USA.

Insgesamt waren in dieser Arbeit mehr weibliche als männliche Patienten vertreten (58% zu 42%). Dies spiegelt sich auch bei den Patienten wider, bei denen MSSA gefunden wurde

(weiblich 65%, männlich 35%). Nur bei MRSA war die Geschlechtsquote anders: hier waren mit 52% vorwiegend Männer betroffen. Dass Männer ein größeres Risiko haben, an MRSA-Infektionen zu erkranken als Frauen, stellten auch Grundmann et al. in ihrer Arbeit von 2010 fest [33].

In dieser Arbeit wurde die Größe der offenen chronischen Wunden nicht berücksichtigt und somit kann keine Aussage über eine MRSA-Häufigkeit hinsichtlich der Ulcusgröße gemacht werden.

Der nasale Abstrich besitzt eine Sensitivität von 53-79% und somit sind vermutlich unter den Patienten auch unentdeckte MRSA-Träger gewesen. Hinzu kommt, dass bei einigen Personen anstatt der Nase andere Körperteile oder –flüssigkeiten kolonisiert sein können (z.B. Urin, Blut). Die Inzidenzrate dieser Studie untermauert dennoch die Notwendigkeit eines MRSA-Screenings bei Aufnahme von Patienten in ein Krankenhaus, wenn bei der Person ein Risikofaktor für eine MRSA-Besiedlung vorliegt, da eine Isolierung des Patienten notwendig ist, um eine weitere Verbreitung des Keims zu verhindern. Denn in der hier überprüften Zeitspanne hätte durch jeden zehnten Patienten eine Keimverschleppung im Krankenhaus stattgefunden. Vor dem Hintergrund, dass ein MRSA-Auftreten einen längeren Krankenhausaufenthalt und einen negativen Einfluss auf Morbidität und Mortalität der Patienten ausübt, ist die Identifizierung von verursachenden Personen essentiell, da MRSA-Träger direkt Mitpatienten anstecken können oder es zu einer Weiterverbreitung durch das Personal kommt, da aufgrund der Unkenntnis über die Infektion keine ausreichenden Hygienemaßnahmen eingehalten werden [96, 34]. Auch von ökonomischer Seite her gesehen ist ein MRSA-Eingangsscreening zu empfehlen, denn die Kosten und Komplikationen, die durch MRSA verursacht werden, weisen deutliche Einsparmöglichkeiten auf [27]. Einer Studie der Universität Münster zufolge wird geschätzt, dass ein MRSA-infizierter Patient in einer chirurgischen Abteilung durch einen fünf Tage längeren Aufenthalt 2.000 € und durch die dazu kommenden medizinischen Kosten noch ein Mal 15.000 € kostet, was zusammen einen Mehraufwand von 20.000 € bedeuten würde. Zudem bekommen 25% der Patienten, die von MRSA kolonisiert sind, eine Infektion. Bei einer MRSA-Prävalenz von 20% und 10.000 Krankenhausaufnahmen pro Jahr schlägt sich das mit 8,5 Millionen Euro jährlich nieder. Eine Prävalenzsenkung um 1% würde somit 425.000 € einsparen. Diller et al. hat in seiner Arbeit von 2008 berechnet, dass pro fünf Patienten, die beim Aufnahmescreening als MRSA-positiv identifiziert werden, 20.000 € gespart werden würden [23]. Die durch konsequente Eradikation hervorgerufenen Erfolge zeigen uns die Niederlande, die durch stetiges Screening von Patienten, sowohl im Krankenhaus als auch ambulant, ihre MRSA-Rate dauerhaft unter

3% halten und bei denen die Kosten für das Eingangsscreening und gegebenenfalls von Isolierungsmaßnahmen weit unter den Behandlungskosten im Fall einer nosokomialen Ausbreitung liegen [123, 26]. Damit kann gezeigt werden, dass sich ein Screening nicht nur bei Risikopatienten, sondern auch generell bei Krankenhausaufnahme lohnt und wie in dieser Arbeit gezeigt, leicht und effizient durch Nasen- und/ oder Wundabstrich durchgeführt werden kann. Somit könnten die Patientenverweildauer und die zusätzlichen Kosten durch Isolierungsmaßnahmen reduziert werden [87]. Die Kosten eines MRSA-Screenings betragen pro negativem Ergebnis 10 €, pro positivem Ergebnis aufgrund der Folgekosten 50 €.

Eine weitere wichtige Maßnahme neben dem Patienten-Screening ist das Überprüfen des Personals auf Keime. Dies ist von Bedeutung, um die notwendigen Hygienemaßnahmen laut Stufenplan einzuleiten. In dieser Studie wurde die Prävalenz der MRSA-Träger unter dem Personal nicht berücksichtigt. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass unentdeckte MRSA-Träger unter dem Personal ein wichtiges MRSA-Reservoir darstellen [6]. Durch edukative Schulung des Personals insbesondere hinsichtlich der Händehygiene können MRSA-Raten deutlich gesenkt werden, allerdings ist unter normalen Umständen nur bei 50% des Personals eine Bereitschaft vorhanden, sich zwischen Patientenkontakten die Hände zu waschen [15, 92].

Vier der insgesamt 22 ermittelten *spa*-Typen (t032, t003, t004, t008) sind in dieser Studie für 47,8% der positiven MRSA- und MSSA-Nachweise verantwortlich gewesen. Der *spa*-Typ t032 (Barnim) wurde insgesamt elf Mal (22,9%) und damit am häufigsten nachgewiesen. t003, t004 und t008, die je vier Mal (8,3%) ermittelt wurden, folgen an zweiter Stelle. Dies zeigt eine geringfügige Verschiebung im Vergleich zur globalen Häufigkeitsverteilung, denn der t003 (weltweit 11,8%) ist insgesamt der weltweit am häufigsten vorkommende *spa*-Typ, gefolgt von t032 (weltweit 10,3%), t008 (weltweit 6,5%) und t002 (weltweit 5,9%) [45]. Der t004 kommt im globalen Vergleich erst an 15. Stelle (weltweit 1,1%).

MRSA von Tieren der Landwirtschaft („livestock associated“ MRSA – LA-MRSA) wurde seltener als erwartet nachgewiesen. Die LA-MRSA-*spa*-Typen der klonalen Komplexe der CC-Gruppe (z.B. t011, t034, t108, t14, t2510) wurden ausschließlich bei dem mit der Viehhaltung assoziierten *spa*-Typen t011 (zwei Mal) nachgewiesen. Bereits im Jahr 2003 wurde ein immer häufigeres Auftreten der *spa*-Typen t011 und t108 in holländischen Krankenhäusern beobachtet. Es wurde angenommen, dass die Schweinezucht damit im Zusammenhang stehen könnte, denn in Regionen mit hohen Raten dieser *spa*-Typen waren überdurchschnittlich viele Schweinefarmen anzutreffen [21]. Köck et al. machten in einer Studie der Universität Münster Nasenabstriche von 1.600 Schweinen in 40 deutschen Farmen

im Bereich der holländisch-deutschen Grenzregion und verglichen die Risikofaktoren für das Tragen von MRSA zwischen Patienten, die *spa*-Typen trugen, die unter regionalen Schweinen verbreitet waren, mit Patienten, die mit anderen MRSA-Typen besiedelt waren [64]. Dabei konnte festgestellt werden, dass Viehhaltung ein relevantes Reservoir für den Import von MRSA in regionale deutsche Krankenhäuser zu sein scheint. So waren in 70% der Farmen Schweine mit MRSA kolonisiert. Dabei kam eben der *spa*-Typ am häufigsten vor, der auch in dieser Studie vorkam, nämlich der t011. Die Vermutung, dass MRSA von Schweinen auf Menschen übertragen wird, festigt sich durch die Tatsache, dass 23-45% der Schweinehalter und 4,6% der Schweinetierärzte mit MRSA kolonisiert sind [107, 117, 47, 125]. Einige Studien berichten darüber hinaus bereits über die Ausbreitung von MRSA in der Nahrungskette (durch Kontamination von geschlachteten Schweinen oder von Schlachtern), wobei es zu einem Ausbruch von Lebensmittelinfektionen durch einen Enterotoxinproduzierenden MRSA kam [71]. Zudem wurde bereits festgestellt, dass Schweinefarmer höhere antimikrobielle Resistenzen aufweisen als die Normalbevölkerung. Köck et al. weisen deshalb darauf hin, dass bei MRSA-Screeningmaßnahmen der Risikofaktor „Kontakt zu Vieh“ eine Rolle spielen sollte. Auch andere Tiere als Schweine, wie Pferde, Kühe, Hunde, Katzen und Hasen wurden bereits als MRSA-infiziert bzw. -kolonisiert identifiziert [119, 18, 52, 82, 120].

Die Prävalenz von HA-MRSA und CA-MRSA nimmt in Europa in den letzten fünf Jahren ebenfalls stetig zu, wobei der Hauptrisikofaktor für letzteres das Reisen in ein Land mit hoher MRSA-Prävalenz zu sein scheint. Köck et al. weisen aufgrund dieser Zunahme darauf hin, dass Eradikations- und Präventionsmaßnahmen nicht ausschließlich auf Krankenhäuser, sondern auch aufgrund der hohen Prävalenzraten dort auf Pflegeheime, auf die ambulante Versorgung und auf die Veterinärmedizin ausgeweitet werden müssen. Des Weiteren müssen nationale Präventionsstrategien zur Vermeidung der weiteren CA-MRSA-Verbreitung getroffen und umgesetzt werden [63].

Der in dieser Arbeit am häufigsten auftretende MRSA-*spa*-Typ t032 ist auch der insgesamt in Deutschland häufigste Typ (gefolgt von t003 und t001). Der deutschlandweit am häufigsten vorkommende MSSA-*spa*-Typ t008 war in dieser Arbeit in drei der vier Fälle ein MRSA. Jedoch kommen die MSSA-Typen t091 und t084 in dieser Studie wie erwartet häufiger vor als andere MSSA-Typen (13% und 9%) [33].

Sechs der 15 am häufigsten vorkommenden *spa*-Typen im Ridom database traten in dieser Studie nicht auf (t037, t044, t127, t034, t015, t067) [67]. Elf der 22 nachgewiesenen *spa*-Typen treten weltweit unter 0,5% auf, sechs davon sogar  $\leq 0,01\%$  (t232, t469, t764, t2115,

t2242, t3272). Diese sporadisch auftretenden *spa*-Typen zeigen möglicherweise eine Entstehung neuer MRSA in dieser Region an. Insgesamt spricht diese Vielzahl von MRSA-Stämmen innerhalb des Krankenhauses und auch im öffentlichen Leben dafür, dass die *spa*-Typen einer Zirkulation unterworfen sind, die sicherlich zunehmend durch die Globalisierung gefördert wird.

In weiteren Studien, bei denen eine *spa*-Typisierung durchgeführt wurde, waren differente *spa*-Typen als in dieser Arbeit vorherrschend: Harmsen et al. führte ebenfalls eine Studie an der Universität Münster durch und identifizierte die *spa*-Typen t001, t003 und t023 als die vorherrschenden [37], wobei hier auch in anderen Abteilungen als der Dermatologie Abstriche gemacht wurden. In einer anderen deutschen Universitätsklinik entdeckten Mellmann et al. bei 154 Patienten und 21 Personen des Personals 34 verschiedene *spa*-Typen [76]. In einer österreichischen Studie waren von 382 *spa*-Typen die häufigsten t001 (29%), t190 (27%), t008 (14%) und t041 (11%) [92]. Diese Ergebnisse unterscheiden sich bis auf den *spa*-Typ t008 deutlich von denen für diese Arbeit gewonnenen Resultaten und lässt auf eine unterschiedliche regionale Verteilung der *spa*-Typen schließen.

In dieser Studie waren die MRSA-*spa*-Typen homogener verteilt als die MSSA-Typen. So wurden bei einer Anzahl von 25 Patienten mit MRSA sieben verschiedene *spa*-Typen gefunden. MSSA zählte bei 23 Patienten 17 unterschiedliche *spa*-Typen. Dies stellten auch Grundmann et al. fest, die von 2006-2007 in 450 Krankenhäusern in 26 Ländern knapp 3.000 MSSA- und MRSA-Isolate von Patienten mit *S. aureus*-Infektionen sammelten. Dabei wurde eine weite geographische Verteilung der *spa*-Typen gefunden, wobei MSSA breiter gefächert war als MRSA. Zudem deutet die Arbeit darauf hin, dass MRSA-*spa*-Typen vorwiegend in geographischen Clustern auftreten und sich eine begrenzte Zahl an MRSA-Klonen eher in Einrichtungen der Gesundheitsversorgung ausbreiten und weniger im öffentlichen Leben. Dies würde wiederum bedeuten, dass MRSA hauptsächlich von Patienten verbreitet wird, die regelmäßig in unterschiedlichen Krankenhäusern aufgenommen werden. In der Studie von Grundmann et al. machten fünf *spa*-Typen 48% aller MRSA-Isolate aus. Bei MSSA verhielt es sich anders: hier machten dieselbe Prozentzahl der MSSA-Isolate 26 der häufigsten MSSA-*spa*-Typen aus [33]. In der vorliegenden Arbeit machten zwei *spa*-Typen 60% aller MRSA-Isolate aus (t032 und t004). Auch hier war dies bei MSSA anders: 5 *spa*-Typen machten 48% aller MSSA-Typen aus (t091, t002, t012, t084 und t159). Die breitere Verteilung von MSSA könnte dadurch zustande kommen, dass MSSA-Träger ein anderes Reiseverhalten als MRSA-Träger haben, da MRSA-besiedelte bzw. -infizierte Personen typischerweise zur älteren und weniger mobilen Bevölkerung gehören. Des Weiteren gibt es weniger MRSA- als MSSA-

Isolate, da es MRSA erst seit einer deutlich kürzeren Zeitspanne als MSSA gibt und MRSA somit weniger Zeit hatte, sich zu verändern.

Der Altersdurchschnitt des gesamten Patientenkollektivs in dieser Studie lag bei 58 Jahren. Das Alter der Patienten, die mit MRSA und MSSA besiedelt waren, lag etwas darüber: MSSA-Durchschnitt 65,7 Jahre, MRSA-Durchschnitt 60,2 Jahre, insgesamt 62,8 Jahre. Da der Altersdurchschnitt der nicht von MRSA/MSSA-betroffenen Patienten bei nur 50 Jahren lag, weist dies auf ein vermehrtes Auftreten von MRSA und MSSA bei Personen in höherem Alter hin, wobei zu erwarten gewesen wäre, dass der Altersdurchschnitt bei MRSA höher als bei MSSA liegt. Zu einem ähnlichen Ergebnis wie in dieser Arbeit kommen auch Reich-Schupke et al., bei deren Studie die MRSA-positiven Personen ebenfalls einen höheren Altersdurchschnitt hatten, als das gesamte Patientenkollektiv (57,1 Jahre zu 60,2 Jahre) [94]. Es muss jedoch darauf verwiesen werden, dass aufgrund der Auswahl des Patientenkollektivs nicht auf die Allgemeinheit geschlossen werden kann. Jedoch sollte bei der Überlegung, ob bei stationärer Aufnahme ein MRSA-Screening durchgeführt werden soll, das Alter des Patienten berücksichtigt werden.

Die Tragedauer der 22 *spa*-Typen variierte von einem Tag bis zu 143 Tagen. Die Durchschnittstragedauer von MRSA betrug 15,6 Tage, die von MSSA 4,8 Tage. Die längste mittlere Gesamtragedauer hatte der t008 (53,8 Tage), gefolgt vom t084 (44,5 Tage) und dem t032 (14,5 Tage). Diese Studie weist daraufhin, dass die *spa*-Typen t008 und t032, die zu den am weltweit häufigsten vorkommenden Typen gehören, vermutlich unter anderem wegen ihrer Widerstandskraft gegen Eradikation zu diesen dazuzählen. Weitere Arbeiten, in denen die Tragedauer der *spa*-Typen bei Patienten untersucht wurde, sind derzeit rar, sind aber dringend erforderlich. Denn, wie diese Studie indiziert, sollte dem Ausfindig machen dieser *spa*-Typen, die für eine lange Besiedlung verantwortlich sind, eine große Bedeutung beigemessen werden, da durch die lange Kolonisation/ Infektion sowohl die Behandlungskosten durch Therapie und Liegezeit als auch die Mortalitäts- und Letalitätsrate deutlich steigen. Der weltweit am neunt häufigsten vorkommende *spa*-Typ t084 (weltweit 1,42%) kam in dieser Arbeit nur zwei Mal vor. Da er davon jedoch ein Mal über 88 Tage nachweisbar war, gibt es aufgrund der kleinen Untersuchungszahl hier keine signifikanten Auswertungen. Eine Überprüfung der Tragedauer in nachfolgenden Studien wäre deshalb sehr interessant. Insgesamt hat es den Anschein, dass einige *spa*-Typen zu einer längeren Tragedauer neigen als andere. Dies wird in dieser Studie durch den Typ t008 unterlegt, der insgesamt vier Mal nachgewiesen wurde und davon bei drei Patienten über längere Zeiträume (14, 57, 143 Tage). Die drei längeren Tragedauern wurden jedes Mal durch einen MRSA

ausgelöst, so dass sich vermuten lässt, dass MRSA und Tragedauer bei diesem *spa*-Typ einen Zusammenhang haben könnten. Somit könnte angenommen werden, dass der t008 zu einer stärkeren Persistenz neigt und eine erhöhte Virulenz besitzt. Konträr dazu wurde der *spa*-Typ t004 auch insgesamt vier Mal nachgewiesen (jedes Mal MRSA), war jedoch bei diesen Patienten zu 100% nur zu einem Zeitpunkt feststellbar. Dies könnte auf eine geringere Virulenz hindeuten.

Der t032 wurde als einziger *spa*-Typ hinsichtlich der lokalen MRSA-Verteilung häufiger in einer offenen chronischen Wunde/ Ulcus nachgewiesen als im Nasenvorhof. Bei allen anderen MRSA-positiven *spa*-Typen war das Verhältnis von Ulcus- zu Nasenbesiedlung mindestens ausgeglichen (t004, t008, t011, t001), zugunsten der Nasenbesiedlung verschoben (t003) oder ausschließlich die Nase betreffend (t068). Dies steht im Kontrast zu einer Studie aus Mumbai, wo in einer dermatologischen Klinik innerhalb von drei Monaten bei zehn Patienten positive MRSA-Nachweise von offenen chronischen Wunden/ Ulcera nachgewiesen wurden. Nur drei dieser Patienten hatten auch einen positiven MRSA-Befund der Nase [102]. Bei der MSSA-Verteilung zwischen offener chronischer Wunde/ Ulcus und Nase waren die Ergebnisse in dieser Studie bei vier *spa*-Typen ausgewogen (t091, t002, t003, t159), in einem der Fälle zugunsten der Wunde verschoben (t084) und in den weiteren Fällen war entweder ausschließlich die Wunde (t008, t2115, t012, t232, t2242, t3273, t458, t469, t764, t078) oder die Nase betroffen (t026, t009). Das Auftreten bestimmter *spa*-Typen bevorzugt in offenen chronischen Wunden/ Ulcera (t032, t026, t009) kann auf eine erhöhte Virulenz dieser *spa*-Typen hindeuten. In dieser Studie führte eine MRSA-Kolonisation häufiger zu einer Infektion als eine MSSA-Kolonisation. So waren bei MSSA von 28 positiven Abstrichen 64% die Nase betreffend und 36% die Wunde betreffend. Bei MRSA waren von 38 positiven Abstrichen 53% die Nase und 47% die Wunde betreffend. Somit löste MRSA signifikant häufiger eine Infektion aus als MSSA. Davis et al. stellte in einer Arbeit von 2005 fest, dass eine nasale MRSA-Kolonisation das Risiko für eine MRSA-Infektion erhöht. So entwickelten in seiner Studie 19% der Patienten, die bei Krankenhausaufnahme mit MRSA kolonisiert waren und 25% der Patienten, die MRSA während ihres Krankenhausaufenthaltes erwarben, eine Infektion mit MRSA. Im Vergleich dazu erlitten nur 1,5% (MSSA bei Aufnahme) bzw. 2% (MSSA während Aufenthalt) der mit MSSA-kolonisierten Patienten eine Infektion. Somit ist das Risiko einer Infektion laut Davis bei MSSA um 2% und bei MRSA um 25% erhöht [20].

Dies unterstreicht die Forderung nach einem flächendeckenden MRSA-Screening zur schnellen Eradikation, um eine weitere Keimausbreitung und auch eine verstärkte Virulenzentwicklung zu vermeiden. Körber et al. hat die Besiedlung von Ulzera im Jahr 2009

mit den Ergebnissen von vor fünf Jahren verglichen und kommt zu dem Schluss, dass es seit einiger Zeit zu einem Shift vom gram-positiven hin zum gram-negativen Keimspektrum (u. a. *Pseudomonas aeruginosa* oder *Proteus mirabilis*) bei offenen chronischen Wunden gekommen ist [66]. Dies untermauert auch die Studie von Basu et al., der Abstriche bei Patienten mit Ulzera gemacht hat und dabei ebenfalls am häufigsten gramnegative Bakterien (*Pseudomonas spec.*, *Escherichia coli*) gefunden hat [5].

Sowohl bei der Besiedlung durch MSSA, als auch bei MRSA war der häufigste Risikofaktor eine offene chronische Wunde/ Ulcus. Weitere Risikofaktoren waren unter anderem ein Krankenhausaufenthalt sowie eine Antibiotikaeinnahme innerhalb der letzten sechs Monate. Der Kontakt zu einem MRSA-Träger spielte bei der MRSA-Besiedlung ebenfalls eine Rolle: Der Übertragungsweg konnte bei einer Frau durch die *spa*-Typisierung nachgewiesen werden, denn es handelte sich um den gleichen *spa*-Typ wie bei ihrem Sohn (t032).

Dass offene Wunden zumeist von Bakterien besiedelt werden, stellte auch Körber et al. fest, der bei 100 Patienten mit Beinulzera Abstriche anfertigte und dabei 191 bakterielle Isolate und 25 verschiedene Bakterienarten isolierte [66]. Sisirak et al. fertigten innerhalb von drei Jahren 5755 Abstriche auf chirurgischen Stationen von Wunden an und stellten eine MRSA-Rate von 7,6% fest und verweisen damit auf einen Anstieg der MRSA-Infektionen in Wunden [106].

## 4.1 Ausblick

Die in dieser Arbeit ermittelte MRSA-Prävalenz von 12% unterstreicht die Wichtigkeit eines flächendeckenden Screenings, um einer Verbreitung des Bakteriums entgegenzuwirken. Dies wird auch durch die Persistenz einzelner *spa*-Typen deutlich. So zeigte der Typ t008 in drei von vier Fällen eine längere Tragedauer (14, 57, 143 Tage) und könnte sich somit in dieser Zeit ohne adäquate Eradikation ungehindert an Personal und andere Patienten weiter verbreiten. Zudem stellt eine Kolonisation für den Patienten selbst ein erhöhtes Risiko dar, denn MRSA löste in dieser Studie signifikant häufiger Infektionen aus als MSSA. Einer der Gründe dafür könnte die Tragedauer sein, denn diese war in dieser Arbeit bei MRSA im Durchschnitt 11 Tage länger als bei MSSA. Offenbar gibt es bestimmte MRSA-Subtypen, die persistenter sind als andere. In diesem Bereich sollte weitere Forschung betrieben werden, denn MRSA scheint nicht gleich MRSA zu sein.

Eine wichtige Präventionsmaßnahme stellen die regionalen MRSA-Netzwerke dar, die in Zukunft weiter ausgebaut werden sollten.

Des Weiteren müssen die Ergebnisse anderer multiresistenter Bakterien wie z. B. Glykopeptid-resistente Enterokokken und multiresistente Enterobacteriaceae gesammelt und in Datenbanken eingespeist werden, um Gegenmaßnahmen ergreifen zu können.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Afif, 2002. Am J Infect Control. 30:430-3; Karchmer et al, 2002. J Hosp Infect. 51:126-32
- [2] Armstrong DG, Mossel J, Short B, Nixon BP, Knowles EA, Boulton AJ. Maggot debridement therapy: a primer. J Am Podiatr Med Assoc 2002; 92:398–401 52
- [3] Barber M. Methicillin resistant staphylococci. J Clin Path 1961;14:385-93
- [4] Barrett FF, McGehee RF Jr, Finland M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. N Engl J Med 1968; 279:441-448
- [5] Basu S, Ramchuran Panray T, Bali Singh T, Gulati AK, Shukla VK. A prospective, descriptive study to identify the microbiological profile of chronic wounds in outpatients. Ostomy Wound Manage. 2009 Jan;55(1):14-20
- [6] Ben-David D, Mermel LA, Parenteau S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission: the possible importance of unrecognized health care worker carriage. Am J Infect Control 2008; 36: 93–7
- [7] Berger-Bächi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Arch Microbiol. 2002 Sep;178(3):165-71. Epub 2002 Jun 19
- [8] Bowling FL, Salgami ES, Boulton AJM. Larval Therapy: A Novel Treatment in Eliminating Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Diabetic Foot Ulcers. Diabetes Care 2007; 30:370-371
- [9] Boyce JM, White RL, Spruill EY. Impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the incidence of nosocomial staphylococcal infections. J Infect Dis 1983; 148(4):763
- [10] Campbell KM, Vaughn AF, Russell KL, et al. Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an outbreak of disease among military trainees in San Diego, California, in 2002. J Clin Microbiol 2004; 42:4050-4053
- [11] Chaberny IF, Wriggers A, Behnke M, Gastmeier P, Antibiotikaresistenz: Präventionsmaßnahmen deutscher Krankenhäuser bei MRSA: Ergebnisse einer Umfrage unter 134 Krankenhäusern im Rahmen des MRSA-Kiss-Moduls. Dtsch Arztl Int 2010; 107(37): 631-7
- [12] Chambers HF. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997;10(4):781-91

- [13] Chang S, Sievert SM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP et al. Infection with Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance Gene. N Engl J Med 2003; 348:1342-1347
- [14] Chung M, Dickinson G, De Lencastre H, Tomasz A. International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. J Clin Microbiol 2005; 43: 421-426
- [15] Cooper D, Farmery K, Johnson M, Harper C, Clarke FL, Holton P, Wilson S, Rayson P, Bence H. Changing personnel behaviour to promote quality care practices in an intensive care unit. Ther Clin Risk Manag 2005; 1: 321–32. PubMed
- [16] Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin Infect Dis 2006; 42(suppl1):25-34
- [17] Creech CB, Saye E, McKenna BD, Johnson BG, Jimenez N, Talbot TR, Bossung T, Gregory A, Edwards KM. One-year surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization and skin and soft tissue infections in collegiate athletes. Arch Pediatr Adolesc Med. 2010 Jul;164(7):615-20
- [18] Cuny C, Kuehmerle J, Stanek C, Willey B, Strommenger B, Witte W (2006) Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans. Euro Surveill 11:44–47
- [19] Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, et al. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. J Infect Dis 2002; 186:1344-1347
- [20] Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. Clin Infect Dis. 2004 Sep 15;39(6):776-82. Epub 2004 Aug 27
- [21] De Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheuevel MG, Dam-Deisz WD, Boshuizen HC, van de Giessen AW, van Duijkeren E, Juijsdens XW (2007) High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Vet Microbiol 122:366-372
- [22] Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2008 Jul 29

- [23] Diller R, Sonntag AK, Mellmann A, Grevener K, Senninger N, Kipp F, Friedrich AW. Evidence for cost reduction based on pre-admission MRSA-screening in general surgery. *Int J Hyg Environ Health* 2008; 211: 205–12
- [24] Doern GV, Jones RN, Pfaller MA, et al. and the SENTRY study group (North America). Bacterial pathogens isolated from patients with skin and soft tissue infections: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 1997) *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34:65-72
- [25] van Duijkeren E, Wolfhagen MJ, Box AT et al. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2235-2237
- [26] Dutch Working Party Infection Prevention. Management policy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Internet Publication 2003
- [27] Engemann, J. J., Carmeli, Y., Cosgrove, S. E., Fowler, V. G., Bronstein, M. T., Trivette, S. L., Briggs, J. P., Sexton, D. J., Kaye, K. S. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 592-598
- [28] Enright MC, Robinson DA, Randle G et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 76 87-7692
- [29] Fernandez-Guerrero ML, Verdejo C, Azofra J, de Gorgolas M. Hospital-acquired infectious endocarditis not associated with cardiac surgery: an emerging problem. *Clin Infect Dis* 1995; 20(1): 16-23
- [30] Gillet et al. *Lancet* 2001
- [31] Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46 (Suppl 5): S.350-359
- [32] Grisold AJ, Leitner E, Muchlbauer C et al.: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2392–2397
- [33] Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW; European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med.* 2010 Jan 12;7(1):e1000215.

- [34] Hamel M, Zoutman D, O'Callaghan C. Exposure to hospital roommates as a risk factor for health care-associated infection. *Am J Infect Control* 2009 Dec 17 [Epub ahead of print]
- [35] Harbarth S, Fankhauser C, Schrenzel J, Christenson J, Gervaz P, Bandiera-Clerc C, Renzi G, Vernaz N, Sax H, Pittet D. Universal screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission and nosocomial infection in surgical patients. *JAMA*. 2008 Mar 12;299(10):1149-57
- [36] Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothgänger, J., Claus, H., Turnwald, D., Vogel, U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5442-5448
- [37] Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5442-8
- [38] Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *J Am Med Assoc* 1998; 279:593-598
- [39] Hill EE, Peetermans WE, Vanderschueren S, Claus P, Herregods MC, Herijgers P. Methicillin-resistant versus methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* infective endocarditis. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2008; (Epub ahead of print)
- [40] Hof H, Dörries R. *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart 2005, ISBN 3131253134, S. 297-305
- [41] <http://www.earss.rivm.nl>
- [42] <http://www.mrsa-net.org>
- [43] <http://www.p-e-g.de>
- [44] <http://www.ridom.de/spaserver/>
- [45] <http://www.spaserver2ridom.de/frequencies.shtml>
- [46] <http://www3.rki.de/SurvStat/QueryForm.aspx>
- [47] Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheувel MG, Heck MEOC, Pluister GN, Voss A, Wannet WJB, de Neeling AJ (2006) Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5:26
- [48] Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, Gagnon F, Truchon K, Bastien M, Picard FJ, van Belkum A, Ouellette M, Roy

- PH, Bergeron MG. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J Clin Microbiol. 2004 May;42(5):1875-84
- [49] Ito T, Ma XX, Takeuchi F et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase ccrC. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2637-2651
- [50] Jevons MP, Coe AW, Parker MT. Methicillin resistance in staphylococci. Lancet 1963; 1:904-907
- [51] Journal of Clinical Microbiology, July 2001, p.2541-2547. Development of a PCR-Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Level. Francis Martineau, Picard FJ, Danbing Ke, Paradis S, Paul H Roy, Marc Ouelette, Michel G Bergeron
- [52] Juhasz-Kaszanyitzky E, Janosi S, Somogyi P, Dan A, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, Wagenaar JA (2007) MRSA transmission between cows and humans. Emerg Infect Dis 13:630–632
- [53] Karchmer et al. 2002. J Hosp Infect. 51:126-32; Diller et al. 2007. Int J Hyg Environ Health :8
- [54] Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Vet Microbiol 2007; 128: 298-303
- [55] Kipp F, Friedrich AW, Becker K, von Eiff C. Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter Staphylococcus-aureus-Stämme. Dtsch Arztebl 2004; 101:A 2045-2050
- [56] Klein E, Smith DL, Laxmiranayan R. Hospitalizations and deaths caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. Emerg Infect Dis 2007; 13(12):1840-1846
- [57] Klevens et al.: Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. JAMA 298/15/2007. S. 1763
- [58] Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10:505-520
- [59] Kramer A, Wagenvoort H, Ahrén C, Daniels-Haardt I, Hartemann P, Kobayashi H, Kurcz A, Picazo J, Privitera G, Assadian O. Epidemiology of MRSA and current strategies in Europe and Japan. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2010 Feb 10;5(1):Doc01

- [60] Krecki R, Drozdz J, Ibata G, Lipiec P, Ostrowski S, Kasprzak J, Krzeminska-Pakula M. Clinical profile, prognosis and treatment of patients with infective endocarditis—a 14-year follow-up study. *Pol Arch Med Wewn* 2007; 117(11-12):512-520
- [61] Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Wichelhaus A. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bonn: Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2004. [www.p-e-g.de](http://www.p-e-g.de)
- [62] Kresken M, Hafner D, Witte W, Reinert R. Resistenzentwicklung bei Staphylokokken und anderen grampositiven Erregern gegenüber Chemotherapeutika im mitteleuropäischen Raum. *Chemotherapie Journal* 1999; 8:136-145
- [63] Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich AW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 2010 Oct 14;15(41):19688
- [64] Köck R, Harlizius J, Bressan N, Laerberg R, Wieler LH, Witte W, Deurenberg RH, Voss A, Becker K, Friedrich AW, Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals, *Eur J Microbiol Infect Dis*, 2009 November; 28(11): 1375.1382
- [65] Köhler, Eggers, Fleischer, Marre, Pfister, Pulverer. *Medizinische Mikrobiologie*. München 2001, ISBN 3437416405, S. 250-257
- [66] Körber A, Schmid EN, Buer J, Klode J, Schadendorf D, Dissemond J; Bacterial colonization of chronic leg ulcers: current results compared with data 5 years ago in a specialized dermatology department; *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010 Sep;24(9):1017-25. Epub 2010 Mar 4
- [67] Landesinstitut für Gesundheit und Arbeit NRW (LIGA), [www.liga.nrw.de](http://www.liga.nrw.de)
- [68] Ligozzi M, Bernini C, Bonora MG, De Fatima M, Zuliani J, Fontana R. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J Clin Microbiol.* 2002 May;40(5):1681-6

- [69] Lina P, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29(5):1128-1132
- [70] Linde H, Lehn N. Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) – Diagnostik. Dtsch Med Wochenschr 2005; 130: 582–5. CrossRef,PubMed,ChemPort
- [71] van Loo IHM, Diederens BMW, Savelkoul PHM, Woudenberg JHC, Roosendaal R, van Belkum A, Lemmens-den Toom N, Verhulst C, van Keulen PHJ, Kluytmans JAJW (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. Emerg Infect Dis 13:1753-1755
- [72] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339:520-532
- [73] Manzur A, Dominguez MA, Ruiz de Gopegui E, Mariscal D, Gavaldà L, Segura F, Perez JL, Pujol M; the Spanish Network for Research in Infectious Diseases; Natural history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation among residents in community long term care facilities in Spain; J Hosp Infect. 2010 Aug 5
- [74] Matthias Günther: Gefährliche Keime: Immer mehr Infektionen in Schleswig-Holsteins Kliniken, Deutschlandfunk, Sprechstunde vom 27. April 2010
- [75] Meddeb, Zaraa I, Zribi M, Trojjet S, El Euch D, Mebazaa A, Cheikhrouhou R, Mokni M, Fendri C, Ben Osman A; *Staphylococcus aureus* skin infections: a hospital study; Tunis Med. 2009 Nov;87(11):778-81
- [76] Mellmann A, Friedrich AW, Kipp F, Hinder F, Keckevoet U, Harmsen D. Evidence-based infection control methods using spa genotyping for MRSA spread in hospitals; Dtsch Med Wochenschr. 2005 Jun 3;130(22):1364-8
- [77] Melzer, M., Eykyn, S. J., Gransden, W. R., Chinn, S. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than methicillin-susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of British patients with nosocomial infection and bacteremia. Clin Infect Dis 2003; 37: 1453-1460
- [78] Menozzi MG, Eigner U, Covan S, Rossi S, Somenzi P, Dettori G, Chezzi C, Fahr AM. Two-center collaborative evaluation of performance of the BD phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. J Clin Microbiol. 2006 Nov;44(11):4085-94. Epub 2006 Sep 27

- [79] Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in correctional facilities – Georgia, California, and Texas, 2001-2003. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2003; 52:992-996
- [80] Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections among tattoo recipients-Ohio, Kentucky, and Vermont, 2004-2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2006; 55:677-679
- [81] Monnet DL et al. 2004 Emerg Infect Dis. 8:1432-41
- [82] Moodley A, Stegger M, Bagcigil AF, Baptiste KE, Loeffler A, Lloyd DH, Williams NJ, Leonard N, Abbott Y, Skov R, Guardabassi L (2006) spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. J Antimicrob Chemother 58:1118–1123
- [83] Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. Am J Med 1993; 94:313-328
- [84] Musser JM, Kapur V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. J Clin Microbiol 1992; 30: 2058-2063
- [85] Noskin GA, Rubin RJ, SchentangJJ, et al. The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database. Arch Intern Med 2005; 165:1756-1761
- [86] Panlilio A, Culver DH, Gaynes RP, Bannerjee S, Henderson TS, Tolson TS, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20:473-477
- [87] Papia, G., Louie, M., Tralla, A., Johnson, C., Collins, V., Simor, A. E. Screening high-risk patients for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on admission to the hospital: is it cost effective? Infect control Hosp Epidemiol 1999; 20: 473-477
- [88] PEG; [www.p-e-g.de](http://www.p-e-g.de)
- [89] Perkins D, Hogue JS, Fairchok M, Braun L, Viscount HB. Mupirocin resistance screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at Madigan Army Medical Center. Mil Med. 2008 Jun;173(6):604-8

- [90] Peters, G., Becker, K. Epidemiology, control and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Drugs 1996; 52 Suppl 2: 50-54
- [91] Pittet, et al. 2000. Lancet;356:1307-12
- [92] Pittet D, Mourouga P, Perneger TV. Compliance with handwashing in a teaching hospital. Infection Control Program. Ann Intern Med 1999; 130: 126–30
- [93] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science. 239.1988, 487–491
- [94] Reich-Schupke S, Geis G, Reising M, Altmeyer P, Stücker M., MRSA in dermatology - Prospective epidemiological study in employees and patients of a dermatological department of a university hospital., J Dtsch Dermatol Ges. 2010 Aug 1;8(8):607-13. Epub 2010 Feb 24
- [95] Rennie RP, Jones RN, Mutnick AH. SENTRY Program Study Group (North America). Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from skin and soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 2000). Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45(4):287-293
- [96] Resch A, Wilke M, Fink C. The cost of resistance: incremental cost of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in German hospitals. Eur J Health Econ 2009; 10: 287–97. CrossRef,PubMed
- [97] Ridom spa-Server
- [98] Robert-Koch-Institut. Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2008. Epidemiologisches Bulletin vom 27.04.2009
- [99] Robert-Koch-Institut. Erkrankungen durch *Staphylococcus aureus* unter besonderer Berücksichtigung der MRSA. Epidemiologisches Bulletin 25. Februar 2000; S. 5
- [100] Robert-Koch-Institut: Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA. Ergänzt und aktualisiert im Februar 2007; Erstveröffentlichung im Epidemiologischen Bulletin 08/2000
- [101] Ruppitsch W, Indra A, Stöger A, Mayer B, Stadlbauer S, Wewalka G, Allerberger F. Classifying spa types in complexes improves interpretation of typing results for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2006 Jul;44(7):2442-8

- [102] Sachdev D, Amladi S, Natraj G, Baveja S, Kharkar V, Mahajan S, Khopkar U, An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in dermatology indoor patients, 2003 Volume 69 Issue 6 Page 377-380
- [103] Safdar N, Bradley EA. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. *Am J Med* 2008; 121(4):310-315
- [104] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12): 5463-7
- [105] Selvey LA, Whitby M, Johnson B. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: is it any worse than nosocomial methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21(10):645-648
- [106] Sisirak M, Zvizdic A, Hukic M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as a cause of nosocomial wound infections. *Bosn J Basic Med Sci*. 2010 Feb;10(1):32-7
- [107] Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, Capuano AW, Herwaldt LA, Diekema DJ (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in Midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS ONE* 4:e4258
- [108] Stamm AM, Long MN, Belcher B. Higher overall nosocomial infection rate because of increased attack rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Infect* 1993; 21:70-74
- [109] Stanaway S, Johnson D, Moulik P, Gill G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) isolation from diabetic foot ulcers correlates with nasal MRSA carriage. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 75(1):47-50
- [110] Sterry W, Paus R. *Checkliste Dermatologie*. Stuttgart 2005, ISBN 3136970055, S. 563-565
- [111] Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, Isobe H, Dohmae S, Ozaki K, Takano M, Iwao Y, Shibuya M, Okubo T, Yabe S, Shi D, Reva I, Teng LJ, Yamamoto T. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Mar; 52(3):837-45
- [112] Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe 1999-2002. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1627-34

- [113] Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellering RC, Ferraro MJ. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 358(9277):207-208
- [114] Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect* 1993; 25: 97-108
- [115] Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:978-984
- [116] Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 11:1965-1966
- [117] Voss A, Milatovic D, Wallrauch Schwarz C, Rosdahl VT, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13(1):50-55
- [118] Vriens et al. 2005. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 26:629-33
- [119] Walther B, Monecke S, Ruscher C, Friedrich AW, Ehricht R, Slickers P, Soba A, Wleklinski CG, Wieler LH, Lubke-Becker A (2009) Comparative molecular analysis substantiates a zoonotic potential of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Clin Microbiol* 47(3):704-710
- [120] Walther B, Wieler LH, Friedrich AW, Hanssen AM, Kohn B, Brunnberg L, Lubke-Becker A (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Vet Microbiol* 127:171–178
- [121] Wang SH, Sun ZL, Guo YJ, Yang BQ, Yuan Y, Wei Q; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Diabetic Foot Ulcers in a Chinese Care Hospital: Risk Factors for Infection and Prevalence; *J Med Microbiol.* 2010 Jul 1
- [122] Werle E et al. (1994) Convenient single step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucl. Acids Res.* 22, 4354-4355
- [123] Wertheim HF, Vos MC, Boelens HA, Voss A, Vandenbroucke-Grauls CM, Meester MH, Kluytmans JA, Van Keulen PHJ, Verbrugh HA. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use. *J Hosp Infect* 2004; 56: 321–5

- [124] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24719 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39:309
- [125] Wulf M, van Nes A, Eikelenboom-Boskamp A, de Vries J, Melchers W, Klaassen C, Voss A (2006) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in veterinary doctors and students, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 12:1939-1941

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Bp	Basenpaare
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CA-MRSA	„Community-acquired“ MRSA
ddNTP	Didesoxynukleotide
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>mecA</i>	Gen, das für die Methicillinresistenz kodiert
HA-MRSA	„Healthcare-associated“ MRSA
LA-MRSA	“Livestock-associated” MRSA
M	Männlich
MBP	Mega base pair (1 million base pairs)
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCC <i>mec</i>	Resistenzgenkassette des <i>Staphylococcus aureus</i> ; beinhaltet <i>mecA</i> -Gen
<i>spa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
W	Weiblich

## 7 ABBILDUNGS-UND TABELLENVERZEICHNIS

### Abbildungen (Abb.)

---

1	Geschlechtsverteilung des Patientenkollektivs - Gesamt	22
2	Geschlechtsverteilung MRSA/MSSA versus Nicht-MRSA/MSSA	22
3	Geschlechtsverteilung – MSSA und MRSA	23
4	Patientenalter in Bezug zum MSSA- <i>spa</i> -Typ	28
5	Patientenalter in Bezug zum MRSA- <i>spa</i> -Typ	29
6	Patientenalter MRSA, MSSA, Patienten ohne MRSA/MSSA	30
7	Zeiträume des ersten Auftretens von MRSA	31
8	Zeiträume des ersten Auftretens von MSSA	32
9	<i>spa</i> -Typ hinsichtlich Patientenzahl und Tragedauer - MRSA	34
10	<i>spa</i> -Typ hinsichtlich Patientenzahl und Tragedauer - MSSA	35
11	<i>spa</i> -Typ versus mittlere Tragedauer bei MRSA	36
12	<i>spa</i> -Typ versus mittlere Tragedauer bei MSSA	36
13	Lokale MRSA-Besiedlung vs. <i>spa</i> -Typ	38
14	Lokale MSSA-Besiedlung vs. <i>spa</i> -Typ	39
15	Aufteilung der Risikofaktoren bei MRSA-positiven Patienten	40
16	Aufteilung der Risikofaktoren bei MSSA-positiven Patienten	41

### Tabellen (Tab.)

---

1	MRSA-Chronologie	10
2	Synthetische Oligonukleotide	15
3	Geschlechtsverteilung hinsichtlich des <i>spa</i> -Typs	24
4	<i>spa</i> -Typ-Verteilung in der Dermatologie Münster	25
5	MRSA- und MSSA-Häufigkeiten hinsichtlich des <i>spa</i> -Typs	26
6	Vorkommen von MRSA-Risikofaktoren	40
7	Vorkommen von MSSA-Risikofaktoren	41

## **8 DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit behilflich waren und ohne die meine Dissertation in der hier vorliegenden Form nicht gelungen wäre.

Mein erster Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Alexander W. Friedrich und Herrn Prof. Dr. Martin Steinhoff für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die Anregungen und Diskussionen, die diese Arbeit vorangetrieben haben.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Laboratorium für Microbiologie in Enschede, ganz besonders bei dem Leiter des Labors Herrn Dr. Ron Hendrix, den Labormitarbeiterinnen der Dermatologie Münster und dem Team des Hygieneinstituts in Münster für die stetige Unterstützung bei Fragen und Problemen und die vielen hilfreichen Tipps, die mir dadurch die Arbeit wesentlich erleichtert haben und zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Meinem Freund Falco Pichler danke ich für die Liebe und Unterstützung während der Durchführung und Niederschrift dieser Arbeit und auch während meines gesamten Studiums.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Hilfe, Motivation und Rat das Studium und die Doktorarbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wären und auf deren Rückhalt ich immer zählen konnte.

Hamburg, im Januar 2011

## **9 LEBENSLAUF - KIRA KRÖNCKE**

## 10 ANHANG

### 10.1 Erfassung von Risikofaktoren

Risikofaktoren
<ul style="list-style-type: none"><li>• Patient mit MRSA-Anamnese</li><li>• Krankenhausaufenthalt (&gt;24h) innerhalb der letzten 6 Monate:<ul style="list-style-type: none"><li>• in einem deutschen Krankenhaus (Name, Ort)</li><li>• Wiederaufnahme (UKM)</li><li>• in einem ausländischen Krankenhaus (Land)</li><li>• Befund nicht bekannt</li></ul></li><li>• Aufenthalt in einem Alten-/ Senioren-/ Pflegeheim (&gt;24h) innerhalb der letzten 6 Monate</li><li>• Kontakt zu MRSA-Trägern</li><li>• Berufstätig im Gesundheitswesen:<ul style="list-style-type: none"><li>• Krankenhaus</li><li>• Arztpraxis</li><li>• Alten-/ Pflegeheim</li><li>• Sonstiges</li><li>• Nicht bekannt</li></ul></li><li>• Antibiotische Therapie innerhalb der letzten 6 Monate:<ul style="list-style-type: none"><li>• Cephalosporine</li><li>• Fluorchinolone</li><li>• Makrolide</li><li>• Mupirocin</li><li>• Tetracycline</li><li>• Sonstige</li></ul></li><li>• Chronische Pflegebedürftigkeit</li><li>• Katheter (DK, SPDK, PEG etc.)</li><li>• Dialysepflichtigkeit</li><li>• Offene chronische Wunden oder Ulcera</li><li>• Chronisches Ekzem, atopische Dermatitis</li><li>• Akne inversa</li><li>• M. Darier, M. Hailey-Hailey</li><li>• Rhinophym, Rosacea</li><li>• Virusinfektion:<ul style="list-style-type: none"><li>• Hepatitis</li><li>• HIV</li><li>• Sonstige</li></ul></li><li>• Immunsuppression</li><li>• Organtransplantation</li><li>• Sonstige Dauermedikation</li><li>• MRSA-Sanierung durchgeführt:<ul style="list-style-type: none"><li>• wann</li><li>• wie</li><li>• wer/ wo</li></ul></li></ul>