

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

des Zentrums für Diagnostische Medizin

des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher

**Etablierung der Spa-Typisierung zur Charakterisierung von  
*Staphylococcus aureus*-Isolaten am Universitätsklinikum Hamburg-  
Eppendorf**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Stefanie Scherpe

aus Stade

Hamburg , 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 15.07.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Kaulfers

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. van Wulffen

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Polywka

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Fragestellung/Hypothese</b>	I
<b>1.) Einleitung</b>	
1.1) <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.2) Virulenzfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.1.3) Typische Erkrankungen durch <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.1.3.1) Invasive <i>Staphylococcus aureus</i> -Infektionen	4
1.1.3.2) Toxinvermittelte <i>Staphylococcus aureus</i> -Infektionen	5
1.1.4) Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	6
1.1.4.1) Epidemiologie der Methicillin-resistenten <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	7
1.2) Typisierungsmethoden	9
1.2.1) Bewertung und Einteilung von Typisierungsmethoden	9
1.2.2) Phänotypische Typisierungsverfahren	10
1.2.3) Genotypische Typisierungsverfahren	11
1.2.4) Typisierung von <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.2.4.1) Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	13
1.2.4.2) <i>Staphylococcus aureus</i> Protein A- (Spa-)Typisierung	15
1.3) Ziel der Arbeit	17
<b>2.) Material und Methoden</b>	
2.1) Material	18
2.1.1) Lösungen und Nährmedien für die Pulsfeldgelelektrophorese	18
2.1.2) Lösungen und Nährmedien für die Spa-Typisierung	20

2.1.3)	Materialien für die Pulsfeldgelelektrophorese	20
2.1.4)	Materialien für die Spa-Typisierung	22
2.1.5)	Reagenzien und Enzyme für die Pulsfeldgelelektrophorese	23
2.1.6)	Reagenzien und Enzyme für die Spa-Typisierung	24
2.2)	Methoden	
2.2.1)	Bakterienstämme	25
2.2.2)	Pulsfeldgelelektrophorese	26
2.2.2.1)	Anzucht der Kulturen	26
2.2.2.2)	Herstellung der Bakteriensuspension	26
2.2.2.3)	Herstellung der Agarose für die Bakterienblöckchen	26
2.2.2.4)	Giessen der Agaroseblöckchen	27
2.2.2.5)	Übernachtlyse I	27
2.2.2.6)	Übernachtlyse II	27
2.2.2.7)	Waschen	27
2.2.2.8)	Restriktion mit SmaI	28
2.2.2.9)	Herstellung des Pulsfeldgels	28
2.2.2.10)	PFGE-Zeiten	28
2.2.2.11)	Gelfärbung mit Ethidiumbromid und Geldokumentation	29
2.2.3)	Spa-Typisierung	29
2.2.3.1)	DNA-Extraktion	29
2.2.3.2)	Amplifikation der DNA	30
2.2.3.3)	Gelelektrophorese	31
2.2.3.4)	Aufreinigung des Amplifikates	31
2.2.3.5)	Sequenzierung	32
2.2.3.6)	Auswertung der Sequenzierungsergebnisse	32
<b>3.)</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1)	Verteilung der Pulsfeldtypen für 96 MRSA-Stämme 2004	33

3.2)	Verteilung der Spatypen für die 96 MRSA-Stämme 2004	35
3.3)	Korrelation zwischen Pulsfeldgelelektrophoresemustern und den Spa-Typen	37
3.3.1)	Barnimer Epidemiestamm	37
3.3.2)	Berliner Epidemiestamm	37
3.3.3)	Hamburger Epidemiestamm	38
3.3.4)	Rhein Hessen Epidemiestamm	39
3.3.5)	Epidemiestamm EMRSA-16	39
3.3.6)	Süddeutscher Epidemiestamm	40
3.3.7)	Sporadische Stämme	40
3.4)	Clusteranalysen	41
3.4.1)	Cluster 1: „Barnim“	42
3.4.2)	Cluster 2: „Berlin“	42
3.4.3)	Cluster 3: „Süddeutsch/Rhein Hessen“	43
3.4.4)	Cluster 4: „Norddeutsch“	43
3.4.5)	Cluster 5: EMRSA-16	44
3.5)	Spa-Typisierung Süddeutscher und Rhein Hessen Epidemiestamm	44
3.5.1)	Ergebnisse Spa-Typisierung Süddeutscher Epidemiestamm	44
3.5.2)	Ergebnisse Spatypisierung Rhein Hessen Epidemiestamm	45
3.6)	Varianz der Spa-Typen bei MRSA aus klinisch relevanten Materialien	46
3.7)	Anwendung der Spa-Typisierung in Ausbruchssituationen	47
3.7.1)	Ausbruch „weißer“ MRSA 2004	47
3.7.2)	Untersuchung Wundinfektionshäufung mit <i>Staphylococcus aureus</i>	49
<b>4.)</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1)	Vergleich der Verteilungsmuster von Pulsfeld- und Spa-Typen	53
4.2)	Clusteranalysen	53
4.3)	Vor- und Nachteile der Typisierungsmethoden	54
4.3.1)	Vorteil- und Nachteile der Spatypisierung	54

4.3.2)	Vorteil- und Nachteile der Pulsfeldgelelektrophorese	56
4.4)	Vergleich der Verteilung der Spa-Typen mit dem Universitätsklinikum Würzburg	55
4.5)	Die Spa-Typisierung bei phylogenetischen Langzeituntersuchungen	58
4.6)	Die Spa-Typisierung in Ausbruchssituationen	58
4.7)	Probleme bei der Auswertung der Spa-Typisierungsergebnisse	59
4.8)	Einführung der Spa-Typisierung als Typisierungsmethode für <i>Staphylococcus aureus</i>	60
<b>5.)</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>6.)</b>	<b>Referenzen</b>	<b>63</b>
<b>7.)</b>	<b>Anhang</b>	<b>73</b>
7.1)	Tabellarische Übersicht über identifizierte Spatypen	73
7.2)	Tabellarische Übersicht der Sequenzen der gefundenen repeats	74
7.3)	Übersicht über identifizierte Pulsfeldgelelektrophoresemuster	75
<b>8.)</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>82</b>
<b>9.)</b>	<b>Danksagung</b>	<b>85</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>86</b>

## Fragestellung/Hypothese

*Staphylococcus aureus* ist einer der häufigsten humanpathogenen Keime, er verursacht u.a. Haut- und Weichteilinfektionen, Pneumonien, katheterassoziierte Infektionen, Septikämien, Osteomyelitis und die akute Form der Endokarditis. Ein am UKE wie auch deutschlandweit zunehmendes Problem stellen die methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Isolate dar. Infektionen mit MRSA-Stämmen führen zur erhöhten Morbidität und Mortalität und zu erheblichen Kosten für das Krankenhaus. Die Verbreitung von MRSA innerhalb eines Krankenhauses erfolgt in der Regel durch Übertragung einzelner Klone zwischen den Patienten.

Molekulare Typisierungsverfahren sind ein wichtiges Element bei der infektionsepidemiologischen Untersuchung von nosokomialen Erregern. „Golden standard“ der Typisierungsmethoden für *Staphylococcus aureus* ist die zeitlich und finanziell sehr aufwendige Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Ein 2004 erstmalig beschriebenes Sequenzierungsverfahren, die Typisierung von *Staphylococcus aureus* mit Hilfe des *Staphylococcus aureus* variablen Protein A Gens (*spa*), ist bislang nur in einigen Universitätskliniken in Süddeutschland eingeführt worden.

Die Fragestellung dieser Arbeit ist, ob die in Hamburg endemischen MRSA-Stämmen mittels Spa-Typisierung typisierbar sind und ob damit die Etablierung dieses Verfahrens zur molekularen Charakterisierung von *Staphylococcus aureus* am UKE möglich und sinnvoll ist.

Außerdem soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob die Spa-Typisierung auch im Ausbruchsgeschehen einsetzbar ist.

# 1. Einleitung

## 1.1) *Staphylococcus aureus*

Die Gattung *Staphylococcus* gehört neben den Gattungen *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus* zur Familie der *Micrococcaceae*.

Staphylokokken erscheinen unter dem Mikroskop als gram-positive, meist in Haufen gelagerte Kokken, sie sind unbeweglich und bilden keine Sporen.

Das Genus *Staphylococcus* umfasst eine große Anzahl an Spezies, die sich mit Hilfe der Plasmakoagulase in zwei Gruppen einteilen lassen, den Plasmakoagulase-positiven Staphylokokken mit dem Hauptvertreter *Staphylococcus aureus* und den Plasmakoagulase-negativen Staphylokokken, von denen *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus saprophyticus* eine besondere humanpathogene Bedeutung zugeschrieben wird (Brandis et al.).

Auf bluthaltigen Nährböden bilden Staphylokokken runde, glänzende Kolonien von 1-2 mm Durchmesser, die Pigmentierung der Kolonien reicht hierbei von weiß bis goldgelb, wobei *Staphylococcus aureus*-Kolonien häufig goldgelb pigmentiert und von einem Hämolysehof umgeben sind. Obwohl die Staphylokokken zu den fakultativ anaeroben Bakterienarten gehören, ist das Wachstum bei anaerober Bebrütung verzögert, die Kolonien sind meist kleiner und auch bei *Staphylococcus aureus* nicht pigmentiert.

Staphylokokken gehören zu den widerstandsfähigsten humanpathogenen Bakterien, sie überleben eine Hitzeeinwirkung von 60°C über 30 min (Vijaranakul et al.), tolerieren Kochsalzkonzentrationen von bis zu 10%, was die selektive Anreicherung von Staphylokokken aus einer Mischflora, wie z.B. der Rachenflora oder dem Stuhl ermöglicht, und lassen sich aus getrockneten klinischen Materialien sowie aus Staub noch nach Monaten isolieren. Diese Widerstandsfähigkeit ist eine Voraussetzung für die Häufigkeit von Staphylokokken als nosokomiale Infektionserreger (Geipel et al.).

In einer Population von gesunden Erwachsenen sind 30-50% der Erwachsenen mit *Staphylococcus aureus* zumeist in der Nase kolonisiert, 10-20% der Erwachsenen sind hierbei permanent kolonisiert (Noble et al., Ceasewell et al.). Diese *Staphylococcus aureus*-Träger haben ein erhöhtes Risiko für eine endogene

Infektion mit dem Keim (Wenzel et al., Weinke et al., Kluytmans et al., Pujol et al.).

### **1.1.2) Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus***

Es sind mittlerweile ca. 40 Zelloberflächen- oder extrazelluläre Proteine von *Staphylococcus aureus* als potentielle Virulenzfaktoren charakterisiert worden (Arvidson et al., Lowy et al.).

Die meisten *Staphylococcus aureus*-Stämme besitzen eine antiphagozytär wirkende Polysaccharidkapsel (Karakawa et al.). Von den 11 identifizierten Serotypen sind die Typen 5 und 8 bei 75% aller menschlichen Infektionen nachweisbar, die meisten methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*- Stämme sind Kapseltyp 5 (Lowy et al.).

Das 42kD-Oberflächenprotein Protein A gilt als wichtiger Virulenzfaktor dank seiner Eigenschaft, Immunglobuline über deren Fc-Stücke zu binden und damit antiphagozytär zu wirken. Der Opsonierungseffekt der Antikörper wird ausgeschaltet, da die Fc-Stücke nach Bindung mit dem Protein A nicht mehr für die Fc-Rezeptoren der Phagozyten zur Verfügung stehen (Boyle et al.).

Außerdem bindet das Protein A Immunglobuline auch über Fab-Region. Diese Interaktion führt zu einer direkten B-Zellstimulation, die aber funktionell noch nicht ausreichend charakterisiert ist (Graille et al.).

Der Clumpingfaktor ist ebenso ein Bestandteil fast aller *Staphylococcus aureus*-Zelloberflächen und ist funktionell ein Fibrinogenrezeptor. Er führt vorwiegend durch Aktivierung von Fibrinmonomeren zu einer Verklumpung von Plasma und ist ein wichtiges Adhäsion durch seine spezifische Bindungsfähigkeit an Fibrinogen (Brandis et al.).

Die Fibronectin-Bindeproteine sind weitere Oberflächenproteine von *Staphylococcus aureus*, die alle funktionell als Adhäsionsmoleküle für weitere Matrixproteine eine wichtige Rolle spielen, Beispiele hierfür sind die Fibronectin-bindenden Proteine FnbpA und FnbpB (Flock et al., Frömson et al.).

Das Enzym Plasmakoagulase wird von *Staphylococcus aureus*-Stämmen extrazellulär abgegeben und führt zu einer Verklumpung von Plasma. Die Koagulase verbindet sich mit dem Prothrombin zum Staphthrombin, wodurch die

Aktivierung des Fibrinogens zu Fibrin ausgelöst wird. Die pathogenetische Bedeutung der Koagulase liegt in der Bildung eines Fibrinschutzwalles um die ins Gewebe eingedrungenen Staphylokokken, in dem die Bakterien sich ungestört vermehren können, um dann nach Einsatz des Staphylokokken-eigenen Enzyms Fibrinolysin diesen Fibrinschutz aufzulösen und sich in die Umgebung auszubreiten (Brandis et al.).

Staphylokokken sezernieren verschiedene Hämolsine, die zur Lyse von Erythrozyten führen. Bekannt sind die Hämolsine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , wobei dem  $\alpha$ -Hämolysin mit seiner Eigenschaft neben der Erythrozytenlyse auch zytotoxisch auf Thrombozyten, Endothelzellen und Epithelzellen zu wirken, eine besondere humanpathogene Rolle zugeschrieben wird.

Die von *Staphylococcus aureus*-Stämmen produzierten und extrazellulär wirkenden Leukozidine führen selektiv zum Zelltod von Granulozyten und Makrophagen.

Ein besonderes Leukozidin, das Panton-Valentine-Leukozidin, ist in den sich momentan in der Normalbevölkerung ausbreitenden community-acquired MRSA (CA-MRSA) nachweisbar und ist assoziiert mit schweren Haut- und Weichteilinfektionen (Cribier et al.)

Bei den von den meisten *Staphylococcus aureus*-Stämme gebildeten Hyaluronidasen handelt es sich um Depolymeridasen, die im Stande sind, die intrazellulären Kittsubstanzen aufzulösen und damit die Gewebsinvasivität zu begünstigen.

Verschiedene klinisch bedeutsame Toxine sind bekannt und charakterisiert, wobei nur einige wenige *Staphylococcus aureus*-Stämme zur Toxinbildung im Stande sind:

Die Exfoliativtoxine A und B führen zur Epidermolyse durch eine intraepidermale Spaltbildung zwischen dem Stratum spinosum und dem Stratum granulosum der Epidermis.

Die Enterotoxine mit den beiden Hauptvertretern Enterotoxin A und B sind sehr hitzeresistent und werden auch bei 100°C nach 30 min nicht vollständig inaktiviert.

Das Toxic-Shock-Syndrom Toxin 1 (TSST-1) ist ein chromosomal kodiertes Protein, das als Superantigen wirkt und damit über die Bindung an MHC Klasse II-Proteine die T-Zellaktivierung bewirkt, wodurch die Produktion von Zytokinen,

vor allem von Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  stimuliert wird (Marrack et al.).

### **1.1.3) Typische Erkrankungen durch *Staphylococcus aureus***

Die durch *Staphylococcus aureus* verursachten Erkrankungen lassen sich in invasive und toxinvermittelte Erkrankungen einteilen:

#### **1.1.3.1) Invasive *Staphylococcus aureus*-Infektionen**

Bei den invasiven Prozessen kommt es nach Infektion und lokaler Vermehrung bedingt durch die Gesamtheit der Virulenzfaktoren zur fortschreitenden Schädigung.

Eine typische Hautinfektion durch *Staphylococcus aureus* ist das Furunkel, ein Hautabszess ausgehend von den Talgdrüsen oder den Haarbälgen. Ein Zusammenschluss mehrerer Furunkel wird als Karbunkel bezeichnet. *Staphylococcus aureus* wird häufig bei Wundinfektionen isoliert und ist zusammen mit *Streptococcus pyogenes* an der Impetigo contagiosa beteiligt (Easmon et al.).

Die Mastitis puerperalis und die eitrige Parodontitis werden ebenso durch *Staphylococcus aureus* verursacht wie in den meisten Fällen die primär hämatogene Osteomyelitis und die postoperative oder posttraumatische sekundäre Osteomyelitis, wobei die sekundäre Osteomyelitis zur Chronifizierung neigt.

*Staphylococcus aureus* ist einer der häufigsten Erreger nosokomial aber auch ambulant erworbener Pneumonien, insbesondere bei Pneumonien, die als Superinfektion nach Virus-pneumonien oder nach Aspiration auftreten, wobei diese Pneumonien zur Abszessbildung neigen. Abszesse durch *Staphylococcus aureus* können andernorts sowohl in Weichteilen als auch in Organen auftreten, Empyeme in Körperhöhlen wie z.B. der Pleura und in Gelenken (Hahn et al.)

Sämtliche oberflächlichen und tiefen Prozesse wie auch die Fähigkeit zur Fremdkörperinfektion (Steinberg et al.) können eine Keimeinschwemmung in die Blutbahn nach sich ziehen und damit zur Sepsis (Bearman et al., Bone et al.) oder

zur akut ulzerösen Endokarditis führen. Die akute Endokarditis kann sehr foudroyant verlaufen und mit erheblichen Klappendestruktionen einhergehen. Sie ist charakterisiert durch einen schlagartigen Krankheitsbeginn, hohem Fieber und häufigem Befall von nicht vorgeschädigten Herzklappen (Chambers et al.). Die *Staphylococcus aureus*-Endokarditis tritt gehäuft bei intravenösem Drogenabusus auf und imponiert klinisch als Rechtsherzendokarditis im Gegensatz zur Endokarditis lenta, bei der bevorzugt Mitralklappe und Aortenklappe betroffen sind.

### **1.1.3.2) Toxinvermittelte *Staphylococcus aureus*-Infektionen**

Das durch die epidermolytischen Exfoliativtoxine von *Staphylococcus aureus* ausgelöste Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) oder auch Morbus Ritter von Rittershain betrifft vor allem Säuglinge und Kleinkinder und führt zum Bild der verbrühten Haut, ähnlich einer Verbrennung I. bis II. Grades durch eine großflächige Epidermolyse mit Blasenbildung. Eine gefürchtete Komplikation ist der Volumenmangel bis hin zum Schock aufgrund von Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten.

Die durch Enterotoxine ausgelöste Gastroenteritis ist eine reine Toxikose und verläuft hochakut, bereits wenige Stunden nach der Toxinaufnahme kommt es zu starkem Erbrechen mit Fieber, gelegentlich Diarrhoen und ev. einer Kreislaufdysregulation. Die Symptome klingen im Gegensatz zu nicht durch *Staphylococcus aureus*-verursachten Gastroenteritiden bereits nach 24-48 Stunden ab.

Das Toxic Shock Syndrome (TSS) imponiert durch die Leitsymptome Fieber, Hypotonie und einem über Extremitäten, Schultergürtel und Stamm ausgebreiteten Exanthem in der Akutphase. Das Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) kann durch seine Funktion als Superantigen mit einer stark vermehrten Ausschüttung von Zytokinen den Schockzustand herbeiführen und kann damit zu einer Minderdurchblutung mit Gewebshypoxien bis hin zum Multiorganversagen führen. In der Rekonvaleszenzphase kommt es obligat zu einer Desquamation, bevorzugt an Palmar- und Plantarflächen von Händen und Füßen (Chesney et al.).

#### 1.1.4) Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Bereits ein Jahr nach der Einführung des Prototyps der penicillinasefesten Penicilline, dem Methicillin, wurden bereits im Jahr 1961 erste Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme isoliert (Jevons et al.). Es wurde gezeigt, dass diese MRSA gegen alle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme) resistent sind (Brumfitt et al.).

Der Mechanismus der Methicillinresistenz beruht auf der Expressierung eines zusätzlichen Penicillin-bindenden Protein 2, dem PBP2a oder synonym PBP2'. Bei dem PBP2 handelt es sich um eine Transpeptidase, die die Querverbindung der Peptidoglykanschicht der Zellwand katalysiert. Das PBP2a besitzt allerdings im Gegensatz zu dem PBP2 eine stark verminderte Affinität zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika unabhängig von der Anwesenheit eines  $\beta$ -Lactamaseinhibitors wie Clavulansäure, Sulbactam oder Tazobactam (Geipel et al.). Auf genomischer Ebene entspricht dem PBP2a das *mecA*-Gen, ein Teil eines mobilen Genelementes mit der Bezeichnung „Staphylococcus Cassette Chromosome *mec*“ (*Scmec*), von der mittlerweile fünf verschiedene Resistenzkassetten bekannt sind. Das Resistenzphänomen der Methicillinresistenz tritt meistens heterogen auf, oft zeigt nur eine Bakterienzelle von  $10^4$  bis  $10^8$  Zellen einen detektierbaren Resistenztyp (Boyce et al., Hackbarth et al.), was zur Detektion die Steigerung der Expression der Resistenz durch eine niedrige Inkubationstemperatur (30-35°C) und durch eine hohe Salzkonzentration erforderlich macht (Jorgensen et al.).

Im Jahre 1997 traten erstmal MRSA-Isolate mit einer nur noch intermediären Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin (VISA) auf (Hiramatsu et al.), 1998 folgten dann auch erste Berichte über dieses Resistenzphänomen in Deutschland (Anonymus).

In den USA kam es 2002 erstmals zum Nachweis eines Vancomycin-resistenten *Staphylococcus aureus* (VRSA), dessen Resistenz auf der seit längerem bekannten plasmidkodierten Vancomycin-Resistenz und horizontalem Transfer von Enterokokken auf einen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* beruht (Centers of disease control 2002, Sieradzki et al.).

### 1.1.4.1) Epidemiologie der Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) stellen ein weltweit zunehmendes Problem dar, es gibt jedoch regional erhebliche Unterschiede in Inzidenz, vorherrschenden Genotypen und begleitender Resistenz.

Bei der MRSA-Prävalenz (Anzahl MRSA/Gesamtzahl isolierter *Staphylococcus aureus*) in Europa erkennt man ein deutliches Nord-Südgefälle mit Prävalenzen von unter 5% in den skandinavischen Ländern und in den Niederlanden bis zu Prävalenzen von regional bis zu 50% in süd- und südosteuropäischen Ländern.

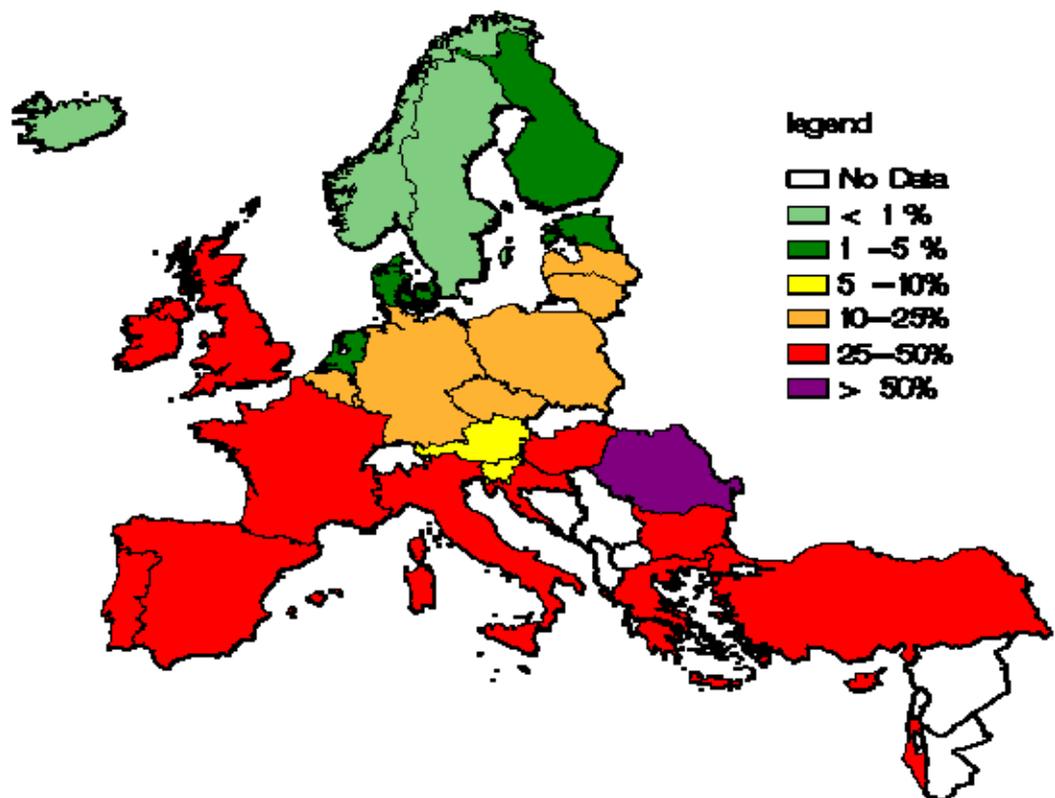


Abb. 1: Verteilung MRSA-Prävalenz in Europa 2006, European Antibiotic Resistance Surveillance System EARSS 2006.

Weltweit findet man in den USA und in Japan in Einzelregionen bereits Prävalenzen von über 70% (Panlilio et al.).

Die Prävalenz von MRSA in Deutschland ist entsprechend der weltweiten Tendenz steigend. Sie betrug 1990 noch 2% und liegt derzeit deutschlandweit bei

20% (Kresken *et al.*), wobei Deutschland in den letzten Jahren europaweit die größte relative Zunahme der Prävalenz von MRSA zu verzeichnen hat (Tiemersma *et al.*). Am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf lag die Prävalenz 2005 bei 10%, was weit unter dem Bundesdurchschnitt lag.

Diese steigenden Prävalenzen gehen mit erheblichen Konsequenzen einher.

So beträgt die Rate von MRSA-Infektionen bei MRSA-kolonisierten Patienten bis zu 40% (Klimek *et al.*, Peacock *et al.*, Ward *et al.*), diese Infektionen sind zudem mit einer höheren Mortalität assoziiert als die durch Methicillin-empfindliche *Staphylococcus aureus*-Stämme verursachten Infektionen (Whitby *et al.*).

Die steigenden MRSA-Raten sind aber nicht nur für die betroffenen Patienten, sondern auch unter ökonomischen Aspekten alarmierend, so liegen die Mehrkosten bei einer durch MRSA verursachten Infektion bei ca. US\$ 10.000 (Chaix *et al.*).

Ein noch nicht abzuschätzendes Problem stellen die zuerst in den USA isolierten community-acquired MRSA (CA-MRSA) dar. Diese Stämme können eine neue Stufe der Gefahr für die Bevölkerung darstellen, da die bisher getroffenen Maßnahmen und Bestrebungen auf den stationären Bereich beschränkt sind. CA-MRSA-Stämme wurden bei Patienten isoliert, die im Jahr vor dem Erstdiagnose weder hospitalisiert waren noch sonstigen Kontakt zu einer Gesundheitseinrichtung aufwiesen und scheinen sich auch in der Normalbevölkerung auszubreiten (Center of Disease Control 2003, Salgado *et al.*). Die Stämme tragen typischerweise das Panton-Valentine-Leukozidin, bedingt durch dieses Toxin können die CA-MRSA-Stämme auch bei gesunden Menschen außerhalb des Krankenhauses schwere Infektionen verursachen (tiefgehende, nekrotisierende Haut- und Weichteilinfektionen, selten nekrotisierende Pneumonien), die in einzelnen Fällen bereits zum Tod des Betroffenen geführt haben (Harberth *et al.*). Zudem wurden einzelne Ausbrüche mit CA-MRSA auch schon in Deutschland beschrieben (Witte, *Epid. Bulletin* 2004).

Epidemiologisch sind weltweit 11 sich ausbreitende Hauptklone bekannt, die sich in fünf klonale Gruppen verwandter Genotypen von MRSA-Stämmen einteilen lassen. Die Klone dieser fünf Linien sind verantwortlich für die überwiegende Mehrzahl von im Krankenhaus erworbenen MRSA-Stämme weltweit (Robinson

et *al.*) und damit ursächlich für die meisten durch MRSA verursachten Infektionen.

## **1.2) Typisierungsmethoden**

Typisierungsverfahren sind ein wichtiges Mittel bei der Darstellung von Verwandtschaften zwischen Isolaten, insbesondere von nosokomialen Erregern bei infektionsepidemiologischen Untersuchungen. Das Ziel der Untersuchung ist hierbei der Nachweis und die Kontrolle von Ausbrüchen und damit auch das Verhindern weiterer nosokomialer Infektionen. Mittels Typisierungsverfahren kann man zudem nachweisen, ob zwei aufeinander folgende Infektionsepisoden durch den gleichen Erreger bedingt sind und eine Fokussuche gestartet werden muß (Murray et *al.*). Man kann mit Hilfe der Typisierungsmethoden epidemische von sporadisch auftretenden Stämmen unterscheiden und mögliche Infektionsketten oder auch Streuquellen nachweisen, um schnellstmöglich entsprechende hygienische Maßnahmen einleiten zu können.

### **1.2.1) Bewertung und Einteilung von Typisierungsmethoden**

Zur Bewertung von Typisierungsverfahren bedient man sich Primär- und Sekundärkriterien. Die drei Primärkriterien sind die Typisierbarkeit, das heißt, die Stämme müssen ein eindeutiges positives Ergebnis in der Untersuchung erbringen, die Reproduzierbarkeit, bei der das identische Ergebnis erzielt werden muß, wenn die Stämme zu unterschiedlichen Zeiten untersucht werden und das Diskriminierungspotential als Eigenschaft, epidemiologisch nicht verwandte Stämme zu differenzieren.

Die drei Sekundärkriterien bewerten die Interpretierbarkeit der Ergebnisse, die Durchführbarkeit der Methoden und den Kostenaufwand sowie den Grad der Automatisierung und Standardisierung (Wichelhaus et *al.*)

### 1.2.2) Phänotypische Typisierungsverfahren

Typisierungsverfahren lassen sich grundsätzlich zwei Kategorien zuordnen, den phänotypischen oder den genotypischen Methoden.

Die Phänotypisierung charakterisiert und differenziert die Erreger nach ihrem „äußeren Erscheinungsbild“ wie der Antibiotika-Empfindlichkeit oder dem biochemischen Profil, wobei die Expression von Genen eines Genotyps den Phänotyp bestimmt. Zu den phänotypischen Typisierungsmethoden zählen die Biotypisierung, das Antibiotika-Resistenzprofil, die Serotypisierung, die Lysotypie mittels Phagen, die Proteintypisierung und die Multilocus-Enzym-Elektrophorese. Ein genereller Nachteil phänotypischer Methoden liegt in der häufig variablen Expression der Genprodukte. Änderungen in den bakteriellen Wachstumsbedingungen wie Temperatur, Zusammensetzung des Mediums oder pH-Wert können Änderungen in der Expression und damit im Phänotyp bedingen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die phänotypischen Typisierungsverfahren beurteilt nach den Primärkriterien (Murray *et al.*, Olive *et al.*) mit deutlichen Schwächen dieser Methoden insbesondere im Diskriminierungspotential, lediglich die MLEE scheint mit einer guten Reproduzierbarkeit und einem guten Diskriminierungspotential eine adäquate Alternative zu sein, allerdings ist diese Methode in der Durchführung sehr aufwendig.

Methoden	Typisierbarkeit	Reproduzierbarkeit	Diskriminierungspotential
Biotypisierung	Alle	Mäßig	Gering
Antibiotika-Resistenzprofil	Alle	Gut	Gering
Serotypisierung	Variabel	Gut	Mäßig
Lysotypie	Variabel	Gut bis mäßig	Gut bis mäßig
Proteintypisierung	Alle	Mäßig	Mäßig
Multilocus-Enzym-Elektrophorese	Alle	Gut	Gut

Tab. 1: Die phänotypischen Typisierungsmethoden beurteilt nach den Primärkriterien, Tab. modifiziert nach Wichelhaus *et al.*

### 1.2.3) Genotypische Typisierungsverfahren

Die Genotypisierung bedient sich der Analyse der genomischen Struktur und ermöglicht es, über DNA-Polymorphismen die Stämme zu differenzieren. In den letzten Jahren haben sich eine Vielzahl von genotypischen Methoden, die Plasmid- oder chromosomale DNA charakterisieren wie Plasmid-Analysen, Ribotypisierung, Restriktions-Fragment-Polymorphismus, die beiden PCR-basierten Methoden PCR-Restriktions-Fragment-Polymorphismus und random amplified polymorphic DNA mit guten Diskriminierungspotentialen sowie insbesondere die Pulsfeldgelelektrophorese und die Sequenzierungsmethoden wie

das Multilocus Sequence Typing (MLST) und für *Staphylococcus aureus*-Stämme seit 2004 die Spa-Typisierung mit exzellenten Diskriminierungspotentialen (s. Tab.2) als Methoden der Wahl etabliert (Murray et al., Olive et al., Tenover et al., Weber et al.).

<b>Methode</b>	<b>Typisierbarkeit</b>	<b>Reproduzierbarkeit</b>	<b>Diskriminierungspotential</b>
Plasmid-Analyse	Variabel	Gut	Mäßig
Restriktionsenzym-Analyse (REA)	Alle	Mäßig bis gut	Gut
Ribotypisierung	Alle	Gut	Gut
Pulsfeldgel-Elektrophorese (PFGE)	Alle	Gut	Exzellent
PCR-RFLP	Alle	Gut	Mäßig bis gut
RAPD	Alle	Mäßig	Gut bis exzellent
Rep-PCR	Alle	Gut	Gut
AFLP	Alle	Gut	Gut
Sequenzierung (MLST, Spatyping)	Alle	Gut	Exzellent

Tab. 2: Die genotypischen Typisierungsmethoden beurteilt nach den Primärkriterien, Tab. modifiziert nach Wichelhaus et al.

#### **1.2.4) Typisierung von *Staphylococcus aureus***

Verschiedene Typisierungsverfahren sind zur Differenzierung von *Staphylococcus aureus* und speziell von MRSA durchführbar.

Zu Beginn der MRSA-Ära wurden ausschließlich phänotypische Typisierungsmethoden wie die Erstellung von Antibigrammen und lange Zeit die Phagentypisierung eingesetzt.

Beide Methoden sind aus heutiger Sicht in ihrem Diskriminierungspotential und in ihrer Durchführbarkeit limitiert, da zum einen klonal nicht verwandte Stämme ein identisches Antibigramm haben können und verwandte Stämme durch den Verlust oder Erwerb resistenzvermittelnder mobiler genetischer Elemente wie Plasmiden oder Transposons unterschiedliche Empfindlichkeitsmuster exprimieren können, und da zum anderen viele *Staphylococcus aureus*-Stämme nicht mittels Phagentypisierung typisierbar sind (Shopsin et al. 2001).

Mit der Entwicklung der Molekularbiologie wurden diese Methoden durch genotypische Verfahren abgelöst, zunächst über Restriktionsfragmentanalysen von chromosomaler und von Plasmid-DNA, später über den Einsatz von Hybridisierungsverfahren wie der Ribotypisierung und PCR-basierter Methoden wie dem PCR-Restriktionfragmentpolymorphismus bis hin zur Pulsfeldgelelektrophorese (Tenover et al.).

Einzig in ihrem Diskriminierungspotential der Pulsfeldgelelektrophorese mindestens ebenbürtige Typisierungsmethode ist bislang das Multilocus Sequence Typing (MLST). MLST beinhaltet die Amplifizierung, Sequenzierung und Sequenzanalyse von sieben housekeeping genes von *Staphylococcus aureus* (Enright et al.). Die Nachteile dieser Methode liegen in einem hohen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden mit hohen Personalkosten und vor allem in den sehr hohen Kosten pro Typisierung.

##### **1.2.4.1) Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Trotz der Nachteile des hohen Zeitaufwandes und der hohen Apparaturkosten ist die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) golden standard zur Typisierung verschiedener Erreger wie *Staphylococcus aureus*, Koagulase-negative

Staphylokokken, Enterokokken, der Familie der *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas aeruginosa*, Methode der Wahl also bei der Tyisierung der krankenhaushygienischen Problemkeime MRSA, extended spectrum  $\beta$ -lactamase-(ES $\beta$ L-) tragende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae, Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) der Spezies *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* und multiresistente Pseudomonas-Stämme.

In diesem Verfahren wird die gesamte chromosomale DNA des Bakteriums mit selten schneidenden Restriktionsenzymen gespalten und in einem Agarosegel aufgetrennt.

Vor der Einführung des Pulsfeldgelelektrophorese im Jahre 1984 (Schwartz et al.) war man nicht in der Lage, intakte DNA eines vollständigen Chromosoms zu verarbeiten, da die DNA wegen der vorhandenen Scherkräfte, die auf die langen DNA-Moleküle wirken, bei den Verdauungsschritten in den flüssigen Verdauungspuffern in unzählige kleine Fragmente zerfällt. Das Problem der auftretenden Scherkräfte wird bei der Pulsfeld dadurch bewältigt, dass man intakte Bakterien in Agarosegelblöckchen eingießt und alle Schritte wie die Lyse der Bakterienwand, Waschschrte und der Restriktionsverdau in diesen Blöckchen durchgeführt wird, die DNA ist so in der Agarose eingebettet vor Scherkräften geschützt.

Die zweite Besonderheit bei der PFGE besteht dann in der Auftrennung der Fragmente im Agarosegel. Vor der Einführung der PFGE war eine Auftrennung von DNA-Fragmenten nur bis zu einer Größe von 50 kB möglich, größere Fragmente zeigen bei der konventionellen Agarosegelelektrophorese eine identische Wanderungsgeschwindigkeit und konnten bislang nicht aufgetrennt werden, daher war es nicht möglich, das gesamte Genom von Bakterien, das um die 4500kB umfasst, aufzutrennen. Bei der Pulsfeldgelelektrophorese liegt das Agarosegel in der Kammer zwischen drei im Hexagon angeordneten Elektrodenpaaren. Die Orientierung des elektrischen Feldes wird regelmäßig nach einem bestimmten Intervall verändert, dadurch werden die DNA-Fragmente nach jedem Wechsel des Feldes neu orientiert und können erst dann weiter wandern, kürzere Fragmente erreichen die neue Orientierung schneller als lange und wandern daher schneller durch das Gel (Prevost et al.)

Die entstandenen Bandenmuster werden nach den Tenover-Kriterien beurteilt: Stämme gelten als identisch, wenn kein genetisches Ereignis und damit keine

unterschiedlichen Fragmentmuster auftreten. Das Isolat ist Teil des Ausbruchs mit der Einschränkung für epidemiologisch dominante Stämme. Stämme gelten als nahe verwandt bei einem genetischen Ereignis, z.B. einer Punktmutation oder bei Aufnahme oder Verlust eines DNA-Fragmentes, im Bandenmuster sieht man 2-3 abweichende Fragmente, das Isolat ist noch wahrscheinlich Teil des Ausbruchs. Möglicherweise verwandt dann schon 2 genetische Ereignisse mit 4-6 unterschiedlichen Fragmenten, das Isolat ist nur noch vielleicht Teil des Ausbruchs und schließlich die unterschiedlichen Stämme mit 3 oder mehr genetischen Ereignissen und mehr als sieben Banden Differenz, diese Isolate können epidemiologisch nicht mehr als Teil eines Ausbruchs interpretiert werden (Tenover et al.)

#### 1.2.4.2) *Staphylococcus aureus* Protein A- (Spa-)Typisierung

Die Spa-Typisierung als eine neue Typisierungsmethode für *Staphylococcus aureus* und damit für MRSA wurde erstmalig 1996 beschrieben (Frenay et al.).

Man vervielfältigt mit der PCR und sequenziert dann eine polymorphe Region, die sogenannte Xr-Region die sich am 3`-Ende vom Protein A von *Staphylococcus aureus* befindet (Guss et al.).

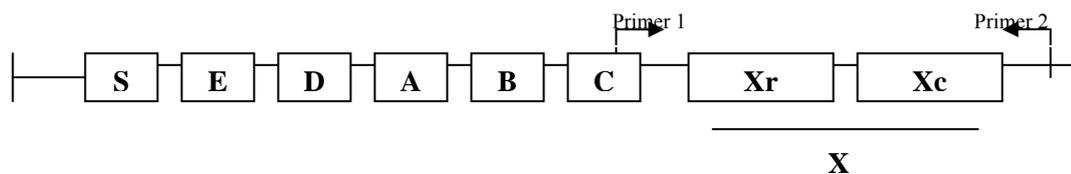


Abb.2: Genetischer Aufbau vom Protein A, Abb. modifiziert nach Shopsin et al. 1999

Protein A zusammengesetzt aus der Signalsequenz (S), den Immunglobulin G-bindenden Regionen (A-D), einer Region, die homolog zu A-D ist (E) und dem COOH-Terminus (X), bestehend aus der Repeatregion Xr und der Sequenz für die Zellwandbindung (Xc).

Diese Xr-Region zeichnet sich dadurch aus, dass sie genetisch stabil ist, Rekombinationsereignisse sind wesentlich seltener als Punktmutationen.

Die Xr-Region wird auf beiden Seiten von hochkonservierten Regionen flankiert, die es erlauben, in dieser Region primer für eine PCR-Amplifikation mit anschließender Sequenzierung der Region zu generieren, die alle *Staphylococcus*

*aureus*-Stämme erkennen. Man vervielfältigt in der PCR eine Abfolge von sich wiederholenden Basenpaaren (repeats), wobei ein repeat im Mittel aus 24bp besteht (Uhlen et *al.*). Jedes repeat unterscheidet sich durch Deletions- oder Insertionsereignissen oder durch Punktmutationen (Brigido et *al.*) und bekommt eine eigene Repeatnummer, z.B:

AAA GAA GAC AAC AAA AAA CCT GGT = Repeatnummer r02, 24bp

AAA GAA GAC AAC AAC AAG CCT GGT = Repeatnummer r12, 24bp

AAA GAA GAC GGC AAC AAA AAA CCT GGT = Repeatnummer r30, 27bp

Der Spa-Typ ergibt sich einmal aus der Anzahl der repeats und über die Aneinanderreihung der Repeatidentifikationsnummern.

Die auftretenden Punktmutationen bezeichnet man hierbei als Makrovariation.

Beispiel:

Spatyp t004 : r09 r02 r16 r13 r13 r17 r34 r16 r34

↓ Punktmutation

Spatyp t065: r09 r02 r16 r34 r13 r17 r34 r16 r34

Viel häufiger kommt es aber zur Mikrovariation, nämlich zum Verlust oder zur Verdopplung ganzer repeats wie im folgenden Beispiel:

t002: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17 r16

t003: r26 r17 r20 r17 r12 r17 r17 r16

Es sind mittlerweile 3350 verschiedene Spa-Typen bekannt (Datenbank Ridom Spa Server Stand 01.01.2008).

### **1.3) Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Typisierbarkeit von in Hamburg endemischen MRSA-Stämmen mit dem Verfahren der Spa-Typisierung und damit die Etablierung dieses Verfahrens zur molekularen Charakterisierung von *Staphylococcus aureus* am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

## 2.) Material und Methoden

### 2.1) Material

#### 2.1.1) Lösungen und Nährmedien für die Pulsfeldgelelektrophorese

##### 500ml 5M NaCl

146,1 g NaCl

aqua bid. ad 500ml

##### 100 ml 2M Tris-HCl-Lösung (pH 7,5)

24,24g Tris

aqua bid. ad 100ml

pH-Einstellung mit HCl auf pH 7,5

##### 500 ml 0,5M Na-EDTA-Lösung (pH 7,5)

93,06g Na-EDTA

aqua bid. ad 500ml

##### 1000 ml SE-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA/pH 7,5)

15 ml 5M NaCl

50 ml 0,5M Na-EDTA (pH 7,5)

aqua bid. ad 1000ml

##### 5ml 1,6%ige LMP-Agarose

80 mg Low melting point- (LMP-)Agarose

5 ml SE-Puffer

Aufkochen und verwenden oder bei -20°C einfrieren

##### Lysis-Lösung I

6mM Tris-HCl pH 7,6

1M NaCl

100mM EDTA pH7,5

0,2% Na-Desoxycholat  
1% Na-Lauryl-Sarkosin  
1 mg Lysozym direkt vor Gebrauch

200 ml Basislösung zur Herstellung der Lysis-Lösung I ohne Lysozym

40 ml 5M NaCl  
40 ml 0,5M Na-EDTA (pH 7,5)  
600 µl 2M Tris-HCl (pH 7,6)  
400 mg Na-Desoxycholat  
2 g Na-Lauryl-Sarkosin  
aqua bid. ad 200 ml

1000 ml ES-Lösung (pH 9,0) zur Herstellung der Lysis-Lösung II

10 g Laurylsarkosin  
1000 ml 0,5M EDTA  
Einstellung pH 9,0 mit NaOH

1000 ml TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM Na-EDTA)

5 ml 2M Tris-HCl (pH 7,5)  
20 ml 0,5M Na-EDTA (pH 7,5)  
aqua bid. ad 1000ml

1000 ml 10 x konzentrierter TBE-Puffer (0,9M Tris, 0,9M Borsäure, 20mM EDTA pH 8)

109 g Tris  
55,6 g Borsäure  
7,4 g Na-EDTA  
aqua bid. ad 1000 ml

1000 ml TSB (Trypton-Soja-Bouillon, Fa. OXOID)

17 g Caseinpepton  
3 g Sojamehlpepton  
5 g NaCl  
2,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,5 g Glucose  
aqua bid. ad 1000 ml  
Einstellung pH 7,3

### 2.1.2) Lösungen und Nährmedien für die Spa-Typisierung

Colombia Blutagar: Fa. OXOID  
LiChrosolv, Wasse für Chromatographie (HPLC): Fa. Merck  
Ethidiumbromid (1 %ig)

#### 10 x konz. TBE- (Tris-Borat-EDTA-) Puffer (pH 8,0)

0,9 M Tris  
0,9 M Borsäure  
20 mM EDTA

#### Probenpuffer

0,25 % Bromphenolblau,  
0,25 % Xylen Cyanol FF,  
15 % Ficol

### 2.1.3) Materialien für die Pulsfeldgelelektrophorese

<u>Verbrauchsmaterial/Gerät</u>	<u>Firma</u>
Zentrifugen 5415-D	Fa. Eppendorf- Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Plastikkämme	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München

pH-Meter CG820	Fa. Schott, Mainz
Pulsfeldgelelektrophoresegerät CHEF DR <sup>®</sup> III Drive Module	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kühlpumpe 1000 Mini Chiller	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pulsfeldgelelektrophoresekammer CHEF Electrophoresis Cell	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spektralphotometer DM4	Fa. Zeiss, Jena
Heizblock Dri-Block <sup>®</sup> DB-3	Fa. Techne Labtack International GmbH, Burckhardtsdorf
Geldokumentationsgerät Bioprint	Fa. Fröbe, Berlin
Video Copy Prozessor Mitsubishi	Fa. Fröbe, Berlin
Videoprint Mitsubishi P91	Fa. Fröbe, Berlin
Waage und Analysenwaage (Feinwaage PC 440)	Fa. Mettler Toledo, Giessen
Agaroseblockgießvorrichtung	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München

#### 2.1.4) Materialien für die Spa-Typisierung

<b><u>Verbrauchsmaterial/Gerät</u></b>	<b><u>Firma</u></b>
Zentrifugen 5415-D	Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1 ml/2 ml	Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Colombia Blutagar	Fa. OXOID GmbH, Wesel
Magnetrührer	Fa. Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Thermocycler Primus96 <sup>plus</sup>	Fa. MWG-Biotech AG, Martinsried
Spannungsgerät Gelelektrophorese 200/2.0 Power Supply	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophoresekammer	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geldokumentationsgerät Bioprint	Fa. Fröbe, Berlin

Video Copy Prozessor Mitsubishi	Fa. Fröbe, Berlin
Videoprint Mitsubishi P91	Fa. Fröbe, Berlin

### 2.1.5) Reagenzien und Enzyme für die Pulsfeldgelelektrophorese

<u>Reagenzien/Enzyme</u>	<u>Firma</u>
Trizma <sup>®</sup> Base	Fa. Sigma Chemical Co, München
EDTA-disodium Serva	Fa. Boehringer-Ingelheim, Heidelberg
Borsäure	Fa. Merck, Darmstadt
NaCl	Fa. Merck, Darmstadt
Na-Desoxycholat	Fa. Sigma Chemical Co, München
N-Laurylsarcosine	Fa. Sigma Chemical Co, München
Lysozym	Fa. Fluka, Steinheim
Lysostaphin	Fa. Sigma Chemical Co, München

Proteinase K	Fa. Fluka, Steinheim
Restriktionsenzym SmaI	Fa. Roche, Basel (CH)
Low melting point-Agarose	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sigma-Agarose	Fa. Sigma Chemical Co, München
1% Ethidiumbromid	Fa. Sigma Chemical Co, München

### 2.1.6) Reagenzien und Enzyme für die Spa-Typisierung

<u>Reagenzien/Enzyme</u>	<u>Firma</u>
InstaGene™ Matrix	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
dNTP-Mix	Fa. Finnzymes, Espoo (SU)
DyNAzyme buffer 10-fach	Fa. Finnzymes, Espoo (SU)
LiChrosolv (HPLC)-Wasser	Fa. Merck, Darmstadt
DyNAzyme DNA-Polymerase	Fa. Finnzymes, Espoo (SU)

1% Ethidiumbromid	Fa. Sigma Chemical Co, München
Staphtype software Version 1.7	Fa. Ridom GmbH, Würzburg
GeneClean <sup>®</sup> II Kit	Fa. Q-BIOgene-GmbH, Heidelberg
Primer	Fa. MWG Biotech AG, Martinsried

## 2.2) Methoden

### 2.2.1) Bakterienstämme

Die in der Arbeit untersuchten Bakterienstämme sind Bestandteil der MRSA-Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Es handelt sich hierbei um klinische Isolate aus dem Jahre 2004, die mit dem Cyrobank<sup>™</sup>-Stammerhaltungssystem der Fa. Mast Diagnostika bei -20°C gelagert wurden. Zur Reaktivierung wurde ein Kügelchen mit einer sterilen Pinzette entnommen und auf einem Colombia Blutagar der Fa. Oxoid ausgestrichen, der dann bei 37°C über Nacht bebrütet wurde.

## **2.2.2) Pulsfeldgelelektrophorese**

### **2.2.2.1) Anzucht der Bakterienstämme**

Ein bis zwei Kolonien einer frischen Kultur von *Staphylococcus aureus* auf Colombia Blutagar wurden mit Hilfe einer Plastiköse in 10 ml TSB gegeben und über Nacht bei  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  angezüchtet.

### **2.2.2.2) Herstellung der Bakteriensuspension**

Die Übernachtskultur wurde gevortext und 800  $\mu\text{l}$  der Übernachtskultur wurden in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 2 min.

Das Pellet wurde in 1 ml SE-Puffer resuspendiert und 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert.

Dieser erste Waschschrift wurde nochmals wiederholt, das Pellet wurde dann nach dem zweiten Waschen in 500  $\mu\text{l}$  SE-Puffer resuspendiert.

### **2.2.2.3) Herstellung der Agarose für die Bakterienblöckchen**

Große DNA-Moleküle und ganze Chromosomen sind sehr zerbrechlich, so dass sie durch Scherkräfte beim Pipettieren während der Isolierung zerstört würden. Um ein Zerbrechen der großen DNA-Moleküle zu verhindern, wurden intakte Zellen in Agarose eingebettet und *in situ* lysiert und entproteinisiert. Die Agarosematrix schützt die eingebettete DNA vor Scherkräften, wodurch die Handhabung der Probe vereinfacht wird.

1,6%ige Low melting point (LMP-)Agarose wurde hergestellt, aufgeköcht, 1 ml in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt und im Heizblock auf  $50^\circ\text{C}$  abgekühlt. Wenn die Agarose ihre Endtemperatur erreicht hat, wurde kurz vor dem Mischen mit der Bakteriensuspension 5 g Lysozym (40 U) und 10  $\mu\text{l}$  Lysostaphin (10,9 U/ml) pro 1 ml Agarose hinzugegeben und ausführlich gevortext.

#### **2.2.2.4) Giessen der Agaroseblöckchen**

125 µl der Bakteriensuspension und 125 µl der 1,6% LMP-Agarose mit Lysozym und Lysostaphin wurden zusammen in ein frisches 1,5 ml Eppendorftube überführt und 2 x 100 µl der Mischung wurden jeweils in den Giessblock pipettiert.

Die Blöckchen wurden zum Aushärten für ca. 20 min in den Kühlschrank gestellt.

#### **2.2.2.5) Übernachtlyse I**

Pro Blöckchen wurde 1 ml frische Lysis-Lösung I (1 ml Basislösung zur Herstellung der Lysislösung, 5 mg Lysozym/ml und 40 Units Lysostaphin/ml) in ein frisches Eppendorftube gegeben. Die untere Folie der Giessvorrichtung wurde abgezogen und das ausgehärtete Blöckchen konnte in die fertige Lysis-Lösung I gleiten und dort über Nacht im Schüttelwasserbad unter leichter Schüttelbewegung bei 37°C inkubieren.

#### **2.2.2.6) Übernachtlyse II**

Zur Entproteinisierung wurde die Lysis-Lösung I durch jeweils 1 ml ESP-Lösung bestehend aus 1 ml ES-Lösung und 2 µl Proteinase K-Lösung (1,09 U/µl) ersetzt und im Brutschrank bei 56°C über Nacht inkubiert.

#### **2.2.2.7) Waschen**

Die Blöckchen wurden in ein 15 ml Falcontube überführt und viermal für je eine Stunde in ca. 10 ml TE-Puffer gewaschen, zwischen den Waschsritten wurde der TE-Puffer jeweils gewechselt.

### **2.2.2.8) Restriktion mit SmaI**

Der Restriktionspuffer A wurde 1:10 mit aqua dest. verdünnt und jeweils 800 µl wurden in 1,5 ml Eppendorftubes überführt. Die Blöckchen wurden in diesen vorbereiteten Restriktionspuffer gegeben und äquilibrierten dort für eine Stunde. Anschliessend wurde der Restriktionspuffer entfernt und jeweils durch unmittelbar vor Beginn des Restriktionsverdaus hergestellten 100 µl Restriktionspuffer A + 4 µl SmaI (10 U/µl) pro tube ersetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Heizblock bei 25°C.

### **2.2.2.9) Herstellung des Pulsfeldgels**

Zwei Liter 0,5 x TBE (100 ml 10 x TBE-Puffer + 1,9 l aqua dest.) wurden aus der Stocklösung verdünnt und für einige Stunden im Kühlschrank bei 6-8°C vorgekühlt. 1,4 g Sigma-Agarose + 140 ml 0,5 x TBE wurden aufgeköcht und anschließend auf ca. 60°C Giesstemperatur abgekühlt. Das Gel wurde gegossen und für ca. 20 min ausgehärtet, 2-4 ml der Agarose wurden zum späteren Verschließen der Geltaschen zurückbehalten und bei 56°C inkubiert. Die Blöckchen wurden dann mit Hilfe von zwei Spateln in die Schlitze des Gels überführt und mit der bei 56°C inkubierten Agarose verschlossen.

In der ersten Geltasche lief jeweils der ebenfalls mit SmaI verdaute Standard *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 mit.

### **2.2.2.10) PFGE-Zeiten**

Das Laufgel konnte nun in das Pulsfeldgelelektrophoresegerät gegeben werden, der vorgekühlte 0,5 x TBE-Laufpuffer wurde hinzugegeben und die Elektrophorese mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Block 1:	5 – 50 s für 28 h
Block 2:	Ø
Spannung:	6,0 V/cm

Winkel:	120°
Umwälzrate der Pumpe:	100%
Kühltemperatur im Mini-Chiller:	14°C

### **2.2.2.11) Gelfärbung mit Ethidiumbromid und Geldokumentation**

Das Gel wurde nach den 28 h in 400 ml aqua dest. und 20 µl 1%igem Ethidiumbromid für 25 min. unter leichten Rotationsbewegungen auf dem Schüttler inkubiert.

Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert und anschließend nach den Tenover-Kriterien (Tenover et *al.*) ausgewertet.

### **2.2.3) Spa-Typisierung**

#### **2.2.3.1) DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion wurde mit Hilfe von InstaGene™ Matrix durchgeführt.

Die InstaGene™ Matrix enthält mikroskopisch kleine Partikel, die zweiwertige Kationen binden. Dadurch fehlen den Enzymen, die DNA schneiden können (DNasen), die für die Funktion essentiellen Coenzyme.

Als Ausgangsagarplatte diente eine über Nacht bei 37°C inkubierte Kultur auf Blutagar mit makroskopisch sichtbaren Kolonien, die Agarplatten durften nicht älter als 72h sein.

Nach Aufheizen zweier Wasserbäder auf 56°C und 100°C wurde die InstaGene™ Matrix auf einen Magnetrührer gestellt und mittels im Gefäß befindlichen Magneten bei mittlerer Geschwindigkeit von 400 U/min gemixt. 500 µl HPLC-Wasser wurde in ein 1,5 ml Eppendorftube gegeben und es wurden mit einer Öse ca. drei Bakterienkolonien eingerührt und gut homogenisiert. Es wurde 1 min bei 12000U/min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Bei eventuellen Rückständen wurde nochmals mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze nachpipettiert. Aus dem auf dem Magnetrührer stehenden InstaGene™ Matrix-Gefäß wurden 100 µl entnommen und zu dem Pellet gegeben,

kurz gevortext und für 20 min bei 56°C inkubiert. Während der Inkubation bei 56°C werden Zellverbände gelöst und Enzyme inaktiviert. Nach der Inkubationszeit wurde der Inhalt der tubes für 10 s kräftig gevortext und anschließend bei 100°C für 8 min inkubiert. Bei dieser Inkubation bei 100°C werden die restlichen Zellstrukturen zerstört, so dass die DNA freigesetzt wird. Nach den 8 min Inkubationszeit wurde erneut 10 s kräftig gevortext und anschließend 3 min bei 12000 U/min zentrifugiert. Der Überstand (DNA) wurde vorsichtig abpipettiert und in ein sauberes 1,5 ml Eppendorftube überführt.

### **2.2.3.2) Amplifikation der DNA**

Die Amplifikation der DNA erfolgte mittels PCR unter Einsatz von folgendem Primerpaar:

Spa-1113f: 5'- TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3'

Spa-1514r: 5'- CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3

Die PCR –Reaktion wurde mit 35 Zyklen (94°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 90 s) in einem 50 µl Reaktionsansatz mit folgenden Stocklösungen durchgeführt:

1 µl dNTPs (10mM)

5 µl 10 x Polymerasepuffer

0,5 µl Taq-Polymerase (4 U/µl)

1,5 µl pro primer

Dazu wurde 10 µl der aufgereinigte DNA gegeben sowie 30,5 µl HPLC-Wasser, vor den 35 Zyklen erfolgte eine initiale Denaturierung bei 80°C, nach den 35 Zyklen eine weitere Elongationsphase bei 72°C für 10 min, so dass die Gesamtdauer der PCR ca. 3 h betrug.

### **2.2.3.3) Gelelektrophorese**

Der Erfolg der Amplifikation wurde mittels Gelelektrophorese auf 2%igen Agarosegelen überprüft. Dazu wurden 5 g Agarose 250 ml 1 x TBE – Puffer mit Hilfe der hitzebeständigen Heizplatte und einem Bunsenbrenner aufgekocht. Nach dem Aufkochen wurde die Agarose auf ca. 60°C abgekühlt und unter Vermeidung von Luftblasen in eine Horizontalgelkammer mit eingehängten Kämmen mit 15 oder alternativ 20 Geltaschen gegossen. Nach ca. 20 min war das Gel ausgehärtet und der Kamm konnte entfernt werden.

Das Gel wurde in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und ggf. 1 x TBE-Puffer nachgegossen, so dass das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war.

15 µl des Amplifikats wurden mit 6 µl Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben, an der ersten Position lief zur Abschätzung der Bandengröße ein λ-DNA-Marker (Fa. Finnzymes) mit. Die Auftrennung erfolgte in einem Gleichstromfeld bei einer Spannung von 95 V über 1,2 h. Die Gelfärbung erfolgte mit Ethidiumbromid (20 µl Ethidiumbromid 1 %ig in 400 ml 0,5 x TBE-Puffer) für 25 min unter leichter Rotationsbewegungen auf dem Schüttler. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden mittels UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

### **2.2.3.4) Aufreinigung des Amplifikates**

Die Aufreinigung des Amplifikates zur Beseitigung von Primern, Enzymen und Salzen erfolgte mit Hilfe des GeneClean® II Kit der Firma Biorad. Dazu wurden 90 µl NaI, 5 µl Glassmilch und ca. 30 µl des Amplifikates in ein 1,5 ml Eppendorftube gegeben, kurz gevortext und 5 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde für 1 min bei 20000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die an die Glassmilch gebundene DNA wurde in 1000 µl Waschlösung zur Entfernung der Salze resuspendiert, 1 min bei 20000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut für 1 min bei 20000 U/min zentrifugiert, um danach den Rest Waschlösung abzupipettieren. Das Glassmilchpellet wurde in 10 µl HPLC-Wasser resuspendiert und für 10 min im Wasserbad bei 56°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde nochmals ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 20000 U/min durchgeführt und der Überstand in ein frisches Eppendorftube überführt.

#### **2.2.3.5) Sequenzierung**

Der Überstand wurde luftgetrocknet zusammen mit dem primer 1 spa-1113f zu MWG Biotech AG nach Martinsried geschickt, wo die Sequenzierungsreaktion, die Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte und die Sequenzanalyse auf einem ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer durchgeführt wurde.

#### **2.2.3.6) Auswertung der Sequenzierungsergebnisse**

Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse inklusive der Clusteranalysen erfolgte mit Hilfe der Staphtype software Version 1.7 der Firma Ridom (Ridom GmbH, Würzburg).

## **3. Ergebnisse**

### **3.1) Verteilung der Pulsfeldtypen für 96 MRSA-Stämme 2004**

Zum Vergleich der beiden Typisierungsverfahren Pulsfeldgelelektrophorese und Spa-Typisierung wurden 96 zufällig ausgewählte MRSA-Stämme verschiedener Patienten aus dem Jahre 2004 mittels der beiden genotypischen Typisierungsmethoden charakterisiert

Die Pulsfeldgelelektrophoresemuster wurden hierbei streng nach den Tenover-Kriterien ausgewertet, \*1 bedeutet dabei ein genetisches Ereignis mit bis zu drei abweichenden Fragmenten, \*2 bedeutet zwei genetische Ereignisse mit 4-6 abweichenden Fragmenten vom Pulsfeldmuster des jeweiligen Epidemiestammes. Es wurden insgesamt 16 verschiedene Pulsfeldtypen (Bilder s. Anhang) identifiziert mit folgender Verteilung:

<b>Pulsfeldtyp</b>	<b>Anzahl Stämme</b>	<b><u>Prozentualer Anteil</u></b>
A1 = Barnimer Epidemiestamm	<b>45</b>	44%
C1 = Hamburger Epidemiestamm	<b>10</b>	10%
B1 = Berliner Epidemiestamm	<b>9</b>	9%
B2 = Berliner Epidemiestamm*1	<b>5</b>	5%
G1 = Sporadischer Stamm	<b>5</b>	5%
A2 = Barnimer Epidemiestamm*1	<b>4</b>	4%
F1 = Rheinhessen Epidemiestamm	<b>4</b>	4%
D1 = E-MRSA16	<b>3</b>	3%
A3 = Barnimer Epidemiestamm*2	<b>2</b>	2%
G2 = Sporadischer Stamm	<b>2</b>	2%
G3 = Sporadischer Stamm	<b>2</b>	2%
E1 = Süddeutscher Epidemiestamm	<b>1</b>	1%
E2 = Süddeutscher Epidemiestamm*2	<b>1</b>	1%
B3 = Berliner Epidemiestamm*2	<b>1</b>	1%
G4 = Sporadischer Stamm	<b>1</b>	1%
G5 = Sporadischer Stamm	<b>1</b>	1%

Tab. 4: Verteilung der Pulsfeldtypen

\*1 = Ein genetisches Ereignis

\*2 = Zwei genetische Ereignisse

Die Verteilung der Pulsfeldmuster zeigt, daß es einen in Hamburg dominanten Epidemiestamm, den Barnimer Epidemiestamm ohne genetisches Ereignis, mit einem prozentalem Anteil von 45% gibt, die Addition dieser 45% mit den prozentualen Anteilen der Barnimer Epidemiestämme mit einem oder zwei genetischen Ereignissen ergibt einen Gesamtanteil des Barnimer Epidemiestammes von genau 50%.

Es folgen der Berliner Epidemiestamm mit 9% ohne genetisches Ereignis, 5% mit einem genetischen Ereignis und 1% mit zwei genetischen Ereignissen, zusammen 15%, und der Hamburger Epidemiestamm ohne genetisches Ereignis mit 10%.

Den in Deutschland sporadischen Pulsfeldtyp G1 wiesen 5% der Isolate auf, 4% wurden dem Rheinhessen-Epidemiestamm und 3% E-MRSA16-Epidemiestamm zugeordnet.

Der Süddeutsche Epidemiestamm mit 1% sowie eine Reihe weiterer sporadischer Stämme mit prozentualen Anteilen von 1-2% spielen epidemiologisch in Hamburg im Jahre 2004 eine untergeordnete Rolle.

### **3.2) Verteilung der Spatypen für 96 MRSA-Stämme 2004**

Die 96 Stämme wurden parallel mit dem neuen Verfahren zur Typisierung von MRSA, der Spa-Typisierung, charakterisiert. Die Auswertung erfolgte hierbei mit der Ridom StaphType software.

Insgesamt ergab sich bezogen auf die Diskrimination ein ähnliches Verteilungsmuster der Spa-Typen wie bei den Pulsfeldgelelektrophoresemustern.

Es wurden insgesamt 18 verschiedene Spatypen, von denen drei bislang nicht in der Datenbank hinterlegt waren, gefunden. Die Repeatabfolge der bislang unbekanntenen Spa-Typen lautete:

r26 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r25 r16 r28

r15 r12 r23 r16 r02 r25

r08 r21 r17 r34 r24 r34 r22 r24 r34 r22 r33 r25

Diese drei Sequenzierungsergebnisse wurden dann der Datenbank übermittelt und ihnen wurde ein neuer Spatyp zugeordnet (t1436, t1447 und t1448). Die Repeatanzahl der gefundenen Spatypen reichte von 6 bis 16 repeats.

Es ergab sich folgende Verteilung der Spatypen:

<u>Spa-Typ</u>	<u>Anzahl Stämme</u>	<u>Prozentualer Anteil</u>
t032	48	50%
t004	14	15%
t431	10	10%
t041	5	5%
t022	2	2%
t018	2	2%
t001	2	2%
t008	2	2%
t110	2	2%
t065	1	1%
t021	1	1%
t002	1	1%
t242	1	1%
t105	1	1%
t003	1	1%
t1436	1	1%
t1447	1	1%
t1448	1	1%

Tab. 5: Verteilung der Spatypen in Hamburg 2004

Die Verteilung zeigt einen in Hamburg dominanten Spa-Typ t032 mit einem prozentualen Anteil von 50% aller gefundenen Spatypen, gefolgt vom Spatyp t004 mit 15%, 431 mit 10%, t041 mit 5% und einer Reihe sporadischer Spa-Typen mit prozentualen Anteilen von 1-2%.

### **3.3) Korrelation zwischen Pulsfeldgelelektrophoresemustern und den Spa-Typen**

Für die untersuchten 96 Stämme wurde die Varianz der gefundenen Spa-Typen für die verschiedenen grundlegenden Pulsfeldmuster ermittelt:

#### **3.3.1) Barnimer Epidemiestamm**

Insgesamt zeigten 51 der untersuchten Stämme das Pulsfeldmuster des Barnimer Epidemiestammes, davon zeigten vier Stämme das Muster mit einem genetischen Ereignis und zwei Stämme das Muster mit zwei genetischen Ereignissen.

Folgende Varianz der Spatypen mit folgenden Repeatabfolgen wurde gefunden:

48 x t032: r26 r23 r23 r13 r23 r31 r29 r17 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r16 r28  
2 x t022: r26 r23 r13 r23 r31 r29 r17 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r16 r28  
1 x t431: r26 r23 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r25 r16 r28

Mit beiden Methoden wurden jeweils drei genotypische Muster ermittelt, allerdings zeigten sämtliche Stämme mit im Pulsfeldmuster genetischen Abweichungen den Spatyp t032, so daß sich diese Abweichungen nicht korrelieren lassen.

Die Varianz der Spatypen ist bedingt durch Deletion oder Duplikation von repeats.

#### **3.3.2) Berliner Epidemiestamm**

Insgesamt zeigten 15 der untersuchten Stämme das Pulsfeldmuster des Berliner Epidemiestammes, davon zeigten fünf Stämme das Muster mit einem genetischen Ereignis und ein Stamm das Muster mit zwei genetischen Ereignissen.

Folgende Varianz der Spatypen wurde ermittelt:

14 x t004: r09 r02 r16 r13 r13 r17 r34 r16 r34

1 x t065: r09 r02 r16 r34 r13 r17 r34 r16 r34

Die Pulsfeldgelelektrophorese fand drei unterschiedliche Pulsfeldmuster, die Spatypisierung hingegen ermittelte für diese insgesamt 15 Stämme hingegen 2 unterschiedliche Genotypen, hierbei wurde der Spatyp t065 bei einem Berliner Epidemiestamm mit im Pulsfeldmuster einem genetischen Ereignis nachgewiesen. Die Varianz der Spatypen ist hier bedingt durch eine Punktmutation in einem repeat (r13 ↔ r34).

### **3.3.3) Hamburger Epidemiestamm**

Insgesamt zeigten zehn der untersuchten Stämme das Pulsfeldmuster des Hamburger Epidemiestammes, es wurden keine Stämme mit genetischen Abweichungen gefunden.

Folgende Varianz der Spatypen wurde ermittelt:

9 x t431: r26 r23 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r16 r28

1 x t1436: r26 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r16 r28

Alle zehn Stämme zeigten ein identisches Pulsfeldmuster, mit der Spatypisierung konnten zwei verschiedene Genotypen diskriminiert werden.

Der Spatyp t1436 beinhaltet einen der bislang in der Datenbank noch nicht hinterlegten Spatypen. Die Varianz ist bedingt durch die Deletion bzw. Insertion eines repeats.

### 3.3.4) Rheinhessen Epidemiestamm

Insgesamt zeigten vier der untersuchten Stämme das Pulsfeldmuster des Rheinhessen Epidemiestammes, es wurden keine Stämme mit genetischen Abweichungen gefunden.

Folgende Varianz der Spatypen wurde ermittelt:

1 x t002: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17 r16

1 x t003: r26 r17 r20 r17 r12 r17 r17 r16

1 x t105: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r17 r17 r16

1 x t242: r26 r23 r17 r13 r17 r20 r17 r12 r17 r16

Auffällig ist hier die hohe Varianz der Spa-Typen im Vergleich zur Pulsfeldgelelektrophorese mit einem genetischen Muster.

Die Varianz ist bedingt durch Deletion, Insertion, Duplikation und durch eine Punktmutation (r13↔r34). Aufgrund dieser hohen Varianz wurden weitere Rheinhessen und Süddeutsche Epidemiestämme aus den Jahren 2002 und 2003 mit Hilfe der Spa-Typisierung charakterisiert (Ergebnisse s. 3.5).

### 3.3.5) Epidemiestamm EMRSA-16

Insgesamt zeigten drei der untersuchten Stämme das Pulsfeldmuster des Epidemiestammes EMRSA-16, es wurden keine Stämme mit genetischen Abweichungen gefunden.

Folgende Varianz der Spa-Typen wurde ermittelt:

2 x t018: r15 r12 r16 r02 r16 r02 r25 r17 r24 r24 r24

1 x t021: r15 r12 r16 r02 r16 r02 r25 r17 r24

Alle drei Stämme zeigten ein identisches Pulsfeldmuster, mit der Spa-Typisierung konnten zwei verschiedene Genotypen diskriminiert werden.

Die Varianz ist bedingt durch Verlust bzw. Duplikation von repeats.

### **3.3.6) Süddeutscher Epidemiestamm**

Insgesamt zeigten zwei der untersuchten Stämme das Pulsfeldmuster des Süddeutschen Epidemiestammes, davon zeigte ein Stamm das Muster mit zwei genetischen Ereignissen.

Folgende Varianz der Spa-Typen wurde ermittelt:

2 x t001: r26 r30 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17 r16

Die Pulsfeldgelelektrophorese fand zwei unterschiedliche Pulsfeldmuster, die Spa-Typisierung hingegen ermittelte für diese zwei Stämme einen identischen Genotyp.

Unter 3.5) wurden aufgrund der klonalen Nähe zum Rheinhessen Epidemiestamm weitere Stämme des Süddeutschen Epidemiestammes mittels Spa-Typisierung charakterisiert.

### **3.3.7) Sporadische Stämme**

Insgesamt zeigten 11 der untersuchten Stämme ein sporadisches Pulsfeldmuster, fünf Stämme mit dem identischen Pulsfeldmuster G1, jeweils zwei Stämme mit identischem Pulsfeldmuster G2 und G3 und jeweils ein Stamm mit dem Pulsfeldmuster G4 und G5. Innerhalb der Pulsfeldmuster gab es keine genetischen Abweichungen.

Folgende Varianz der Spa-Typen wurde ermittelt:

G1:

5 x t041: r26 r30 r17 r34 17 r20 r17 r34 17 r20 r17 r12 r17 r16

G2:

2 x t008: r11 r19 r12 r21 r17 r34 r24 r34 r22 r25

G3:

2 x t110: r26 r30 r17 r12 r17 r16

G4:

1 x t1447: r15 r12 r23 r16 r02 r25

G5:

1 x t1448: r08 r21 r17 r34 r24 r34 r22 r24 r34 r22 r33 r25

Es zeigt sich keine auffällige Varianz der Spa-Typen bei den sporadischen Stämmen.

Die Häufung von t041 war in diesem Jahr bedingt durch einen stationsübergreifenden Ausbruch mit diesem Stamm am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (s.a. 3.7.1).

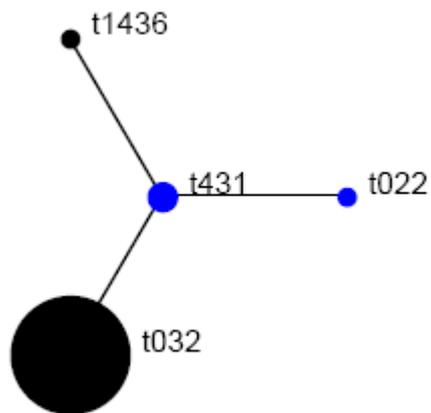
Bei der Auswertung der Varianzen fiel auf, dass ein Stamm mit dem Pulsfeldmuster des Barnimer Epidemiestammes den Spa-Typ t431 aufweist, der ansonsten den Hamburger Pulsfeldtyp charakterisiert. Die folgenden Clusteranalysen (s. 3.4.1) zeigen die Verwandtschaft dieser beiden Stämme, bei genauer Betrachtung der Pulsfeldmuster (s. Anhang) ist der Hamburger Epidemiestamm auch als Barnimer Epidemiestamm mit zwei Ereignissen und sechs abweichenden Fragmenten zu charakterisieren.

### **3.4) Clusteranalysen**

Die gefundenen Spa-Typen wurden mit Hilfe der Funktion BURP (based upon repeat pattern), einem Bestandteil der Ridom Staphtype software, bezüglich ihres Verwandtschaftsgrades analysiert.

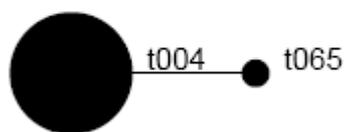
Insgesamt konnten alle 96 Stämme in fünf übergeordnete Cluster eingeteilt werden:

### 3.4.1) Cluster 1: „Barnim“



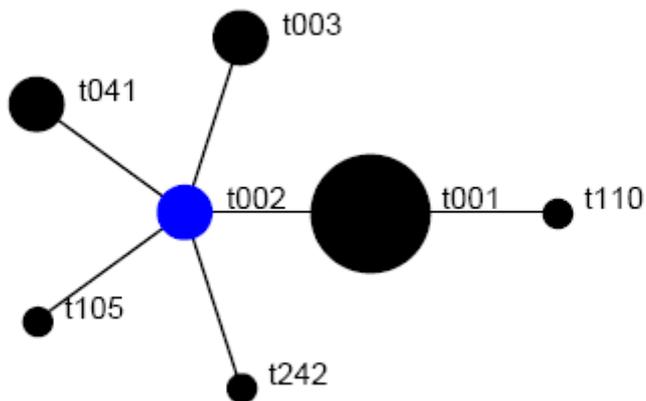
t032: r26 r23 r23 r13 r23 r31 r29 r17 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r16 r28  
t022: r26 r23 r13 r23 r31 r29 r17 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r16 r28  
t431: r26 r23 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r25 r16 r28  
t1436:r26 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r25 r16 r28

### 3.4.2) Cluster 2: „Berlin“



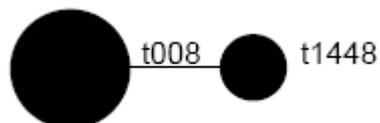
t004: r09 r02 r16 r13 r13 r17 r34 r16 r34  
t065: r09 r02 r16 r34 r13 r17 r34 r16 r34

### 3.4.3) Cluster 3: „Süddeutsch/Rhein Hessen“



t001:	r26 r30 r17 r34 r17 r20 r17	r12 r17	r16
t002:	r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17	r12 r17	r16
t003:	r26	r17 r20 r17	r12 r17 r17 r16
t041:	r26 r30 r17 r34 r17 r20 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17		r16
t105:	r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17	r17 r17	r16
t242:	r26 r23 r17 r13 r17 r20 r17	r12 r17	r16
t110:	r26 r30	r17	r12 r17 r16

### 3.4.4) Cluster 4: „Norddeutsch“



t008:	r11 r19 r12 r21 r17 r34 r24 r34 r22	r25
t1448:	r08 r21 r17 r34 r24 r34 r22 r24 r34 r22 r33 r25	

### 3.4.5) Cluster 5: EMRSA-16



t018: r15 r12 r16 r02 r16 r02 r25 r17 r24 r24 r24

t021: r15 r12 r16 r02 r16 r02 r25 r17 r24

t1447: r15 r12 r23 r16 r02 r25

Diese Clusteranalyse bestätigt die Tatsache, dass es sich bei MRSA um fünf klonale Linien handelt, die sich weltweit ausbreiten, wobei die Cluster von 2-7 Spa-Typen variieren.

Auffällig ist hierbei insbesondere die Vielfalt der Spa-Typen im Cluster Süddeutsch/Rheinhausen. Dies veranlasste zu einer Spa-Typisierung von weiteren Stämmen, die in den Jahren 2000 bis 2003 das Pulsfeldmuster des Süddeutschen oder des Rheinhausen Epidemiestammes zeigten.

## 3.5) Spa-Typisierung Süddeutscher und Rheinhausen Epidemiestamm

### 3.5.1) Ergebnisse Spa-Typisierung Süddeutscher Epidemiestamm

Es wurden 13 weitere MRSA-Stämme aus den Jahren 2000-2003, die im Pulsfeldmuster den Süddeutschen Epidemiestamm zeigten, mittels Spa-Typisierung charakterisiert.

Zusammen mit den zwei bereits vorher typisierten Stämmen wurden für die insgesamt 15 Stämme drei verschiedene Spa-Typen mit folgender Verteilung gefunden:

12 x t001: r26 r30 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17 r16

2 x t002: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17 r16

1 x t067: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17

Der Süddeutsche Epidemiestamm zeigte auch bei 15 Stämmen keine aussergewöhnliche hohe Varianz.

### 3.5.2) Ergebnisse Spatypisierung Rheinhessen Epidemiestamm

Es wurden 11 weitere MRSA-Stämme aus den Jahren 2000-2003, die im Pulsfeldmuster den Rheinhessen Epidemiestamm zeigten, mittels Spatypisierung charakterisiert.

Zusammen mit den vier bereits vorher typisierten Stämmen wurden für die insgesamt 15 Stämme sechs verschiedene Spatypen mit folgender Verteilung gefunden:

5 x t002: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17 r16

4 x t003: r26 r17 r20 r17 r12 r17 r17 r16

3 x t067: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17

1 x t001: r26 r30 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17 r16

1 x t105: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r17 r17 r16

1 x t242: r26 r23 r17 r13 r17 r20 r17 r12 r17 r16

Eine große Varianz mit sechs verschiedenen Spa-Typen wurde für den Rheinhessen Epidemiestamm gefunden.

Die auch bei der Auswertung der Pulsfeldmuster eindeutige klonale Nähe beider Epidemiestämme verdeutlicht der Nachweis von t001 bei einem der Rheinhessen Epidemiestämme, da t001 die überwiegende Zahl der Süddeutschen Epidemiestämme charakterisiert. Umgekehrt wurde bei zwei Süddeutschen Epidemiestämmen der Spa-Typ t002 gefunden, der die überwiegende Zahl der Rheinhessen Epidemiestämme charakterisiert.

### 3.6) Varianz der Spa-Typen bei MRSA aus klinisch relevanten Materialien

20 verschiedene MRSA-Stämme, die 2004 in den klinisch bedeutsamen Materialien Blutkulturen oder Katheterspitzen gefunden wurden und somit eine Infektion verursacht haben, wurden zusätzlich mit der Fragestellung, ob ein oder mehrere Spa-Typen eine erhöhte Virulenz aufweisen, mittels Spa-Typisierung charakterisiert.

Es wurden insgesamt acht verschiedene Spa-Typen gefunden.

Es ergab sich folgende Verteilung der Spatypen:

<u>Spa-Typ</u>	<u>Anzahl Stämme</u>	<u>Prozentualer Anteil</u>
t032	11	55%
t004	2	10%
t001	2	10%
t431	1	5%
t012	1	5%
t030	1	5%
t266	1	5%
t305	1	5%

Tab. 6: Verteilung der Spatypen in Blutkulturen/Katheterspitzen 2004

Man findet eine vergleichbare Verteilung der Spa-Typen in Blutkulturen und Katheterspitzen wie in sämtlichen Materialien mit einer Dominanz des Spa-Typ t032 von ungefähr 50%.

Es gibt keinen Spa-Typ und damit keinen Epidemiestamm, der eine besondere Virulenz hinsichtlich des Infektionspotentials besäße, Infektions- und

Kolonisationsstämme haben ein ähnliches Verteilungsmuster hinsichtlich der Spa-Typen.

### **3.7) Anwendung der Spa-Typisierung in Ausbruchssituationen**

#### **3.7.1) Ausbruch „weißer“ MRSA 2004**

Zu Beginn des Jahres 2004 ereignete sich ein stationsübergreifender MRSA-Ausbruch mit einem phänotypisch auffälligen MRSA-Stamm, der auf bluthaltigem Agar weiß und ohne Hämolysehof und damit leicht zu verwechseln mit einer koagulase-negativen Staphylokokken-Kolonie war. Betroffen waren damals insgesamt 20 Patienten von drei verschiedenen Intensivstationen, der Ausbruch dauerte von Januar bis April 2004.

Sämtliche Stämme zeigten in der Pulsfeldgelelektrophorese das identische Pulsfeldmuster G1 ohne genetische Abweichung (Bilder s. Anhang).

Zur retrospektiven Analyse der Anwendbarkeit der Spa-Typisierung in einer Ausbruchssituation wurden sämtliche am Ausbruch beteiligten Stämme mittels Spa-Typisierung mit folgendem Ergebnis charakterisiert:

<u>Patient</u>	<u>Datum</u> <u>Erstisolierung</u>	<u>Spa-</u> <u>Typ</u>	<u>Pulsfeld-</u> <u>muster</u>
K.S	05.01.2004	<b>t041</b>	G1
M.G.	06.01.2004	<b>t041</b>	G1
K.D.	07.01.2004	<b>t041</b>	G1
W.T.	13.02.2004	<b>t041</b>	G1
D.G.	13.02.2004	<b>t001</b>	G1
Y.B.	17.02.2004	<b>t001</b>	G1
P.G.	11.03.2004	<b>t041</b>	G1
I.W.	11.04.2004	<b>t041</b>	G1
M.K.	19.04.2004	<b>t041</b>	G1
T.B.	19.04.2004	<b>t041</b>	G1
M.N.	25.04.2004	<b>t041</b>	G1
P.F.	27.04.2004	<b>t041</b>	G1
E.P.	29.04.2004	<b>t041</b>	G1
W.M.	30.04.2004	<b>t041</b>	G1
A.M.	03.05.2004	<b>t041</b>	G1
N.C.	03.05.2004	<b>t041</b>	G1
H.R.	04.05.2004	<b>t041</b>	G1
Z.G.	10.05.2004	<b>t041</b>	G1
T.K.	13.05.2004	<b>t041</b>	G1
S.H.	14.05.2004	<b>t041</b>	G1

Tab. 7: Ergebnis Spa-Typisierung und Pulsfeldgelelektrophorese Ausbruch 2004

Bei identischem sporadischem Pulsfeldmuster aller Stämme (s. Anhang) fand sich bei 18 der untersuchten Stämme der Spa-Typ t041, ein Typ der zum Cluster Süddeutsch/Rhein Hessen gehört und zu den sporadischen Typen gezählt werden muß. Ein Nachweis dieses seltenen Stammes bei zwei Patienten, die in epidemiologischem und zeitlichem Zusammenhang stehen, ist somit so gut wie

beweisend für eine Übertragung und ein Nachweis bei mehr als zwei Patienten beweisend für einen Ausbruch mit diesem Stamm.

Überraschend fand sich in der Spa-Typisierung zweimal der Spa-Typ t001, ein Spa-Typ der ebenso zum Cluster Süddeutsch/Rhein Hessen gehört und hier insbesondere den Süddeutschen Epidemiestamm charakterisiert. Würde es sich doch klonal um identische Stämme handeln, müsste es bei dem Spa-Typ t041 zu einer Insertion von vier repeats (r34 r17 r20 r17) bzw. bei dem Spa-Typ t001 zu einem Verlust dieser vier repeats gekommen sein, was aufgrund der zeitlichen Nähe der Erstisolierung sehr unwahrscheinlich ist. Eine Analyse des Ausbruchgeschehens ergab, dass die Patienten D.G. und Y.B. die einzigen Patienten einer Intensivstation waren, auf der ansonsten keiner der Ausbruchstämme auftraten und dass diese Intensivstation räumlich von den anderen betroffenen Stationen abgegrenzt war. Zudem lagen die beiden Patienten in einem Zimmer, eine Übertragung zwischen den Patienten ist sehr wahrscheinlich, zumal der Patient Y.B. in den ersten Abstrichen noch nicht mit MRSA besiedelt war, der Erstdurchbruch erfolgte bei dem Patienten Y.B. zwei Tage nach dem Zusammenlegen mit Patient D.G.

Ein erneutes Ausstreichen der Stämme auf Blutagarplatten zeigte zudem einen phänotypischen Unterschied zu den übrigen Ausbruchstämmen, da hier deutlich bei auch eher weißlicher Koloniefarbe ein Hämolysehof zu erkennen war.

Mit der Spa-Typisierung konnte somit der Ausbruch bestätigt werden, zwei der vermeintlichen Ausbruchstämme konnten retrospektiv als nicht am Ausbruch beteiligt ermittelt werden. Die Spa-Typisierung wäre in dieser Ausbruchssituation also nicht nur schneller und kostengünstiger, sondern auch diskriminativer gewesen.

### **3.7.2) Untersuchung Wundinfektionshäufung mit *Staphylococcus aureus***

Zu Beginn des Jahres 2006 fiel auf einer chirurgischen Station eine auffällige Häufung von postoperativen Wundinfektionen mit einer ungewöhnlichen Häufung von methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus*-Stämmen, die größtenteils ein identisches Antibiogramm mit Penicillinaseaktivität aufwiesen. Aufgrund der Häufung veranlasste die Station zusammen mit der

Krankenhaushygiene ein Ärzte und Pflegepersonal übergreifendes Personalscreening. Mit Hilfe von Nasenabstrichen wurden bei 12 Mitarbeitern und damit 60% aller Mitarbeiter ein *Staphylococcus aureus* isoliert, was einer im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung deutlich erhöhten *Staphylococcus aureus*-Rate entspricht.

Zur Verfügung standen ausserdem Abstriche von sieben Patienten mit Nachweis einer *Staphylococcus aureus*-Wundinfektion, bei zwei Patienten stammten die Isolate aus dem Wundgebiet, bei den übrigen aus anderen Körperregionen, da der Keim aus der Wunde mittlerweile nicht mehr nachweisbar war und nicht aufgehoben wurde.

Da die Station um eine schnelle Aufklärung bat, ob es sich bei der Häufung um den klonal identischen Stamm und ob ggf. ein Mitarbeiter des Krankenhauspersonals Überträger dieses Keimes ist, entschieden wir uns für die Methode der Spa-Typisierung, die auch bei Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus*-Stämmen durchführbar ist.

Insgesamt wurden 19 Isolate spa-typisiert, sieben Isolate stammten von unterschiedlichen Patienten, 12 Isolate von Klinikpersonal.

Folgende Verteilung der Spa-Typen wurde bei den Patienten gefunden:

<u>Patient</u>	<u>Spatyp</u>	<u>Material</u>
C.M.	<b>t166</b>	Wundabstrich
E.-A.F.	<b>t997</b>	Nasenabstrich
L.C.	<b>t1482</b>	Abstrich
N.R.	<b>t021</b>	Tracheostoma
R.M.	<b>t068</b>	Nasenabstrich
M.S.	<b>t065</b>	Gezielte Absaugung
M.S.	<b>t084</b>	Punktat aus Wunde

Tab. 8: Verteilung Spatypen bei betroffenen Patienten

Folgende Verteilung der Spa-Typen wurde beim Klinikpersonal gefunden:

<u>Mitarbeiter</u>	<u>Spatyp</u>	<u>Material</u>
T.D.	<b>t1480</b>	Nasenabstrich
P.E.	<b>t078</b>	Nasenabstrich
M.F.	<b>t136</b>	Nasenabstrich
J.F.	<b>t094</b>	Nasenabstrich
E.F.	<b>t021</b>	Nasenabstrich
R.H.	<b>t1546</b>	Nasenabstrich
M.J.	<b>t015</b>	Nasenabstrich
L.P.	<b>t1525</b>	Nasenabstrich
C.P.	<b>t156</b>	Nasenabstrich
A.R.	<b>t050</b>	Nasenabstrich
N.-O.S.	<b>t216</b>	Nasenabstrich
G.S.	<b>t153</b>	Nasenabstrich

Tab. 9: Ergebnisse Personalscreening *Staphylococcus aureus*

Unter den Patienten finden sich keine klonal identischen Stämme. Beide aus den Wundgebieten stammende *Staphylococcus aureus*-Stämme sind klonal verschieden, auch die übrigen Stämme, die möglicherweise identisch zu den im Wundgebiet isolierten *Staphylococcus aureus*-Stämmen sind, sind klonal verschieden, so dass ein Ausbruch ausgeschlossen werden konnte.

Auch bei den Nasenabstrichen des Klinikpersonals findet man keine klonale Übereinstimmung, was die größere genetische Variabilität bei den Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus*-Stämmen unterstreicht.

Es findet sich einzig eine klonale Identität der Stämme von Patient N.R. und dem Mitarbeiter E.F.. Da die Inzidenz dieses Spatyps in Deutschland bei 0,76% liegt, ist hier von einer Übertragung auszugehen. Der *Staphylococcus aureus*-Stamm beim Patienten stammt allerdings aus einem Nasenabstrich, so dass diese

Übertragung nicht sicher mit der Wundinfektion in Verbindung gebracht werden konnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Methode der Spa-Typisierung erwartungsgemäß auch zur Charakterisierung von Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus*-Stämmen eignet, insbesondere aufgrund ihrer hohen genetischen Variabilität.

## 4. Diskussion

### 4.1) Vergleich der Verteilungsmuster von Pulsfeld- und Spa-Typen

Der Schwerpunkt der durchgeführten Untersuchungen lag im Vergleich der beiden alternativen Typisierungsmethoden hinsichtlich der Primärkriterien Diskriminierungspotential, Typisierbarkeit sowie der Sekundärkriterien Interpretierbarkeit, Praktikabilität, Kosteneffektivität und Automatisierung.

Die Verteilungsmuster bei den 96 untersuchten Stämmen zeigten insgesamt ein vergleichbares Diskriminierungspotential mit der Unterscheidung von 16 verschiedenen Genotypen in der Pulsfeldgelelektrophorese gegenüber 18 verschiedenen Genotypen in der Spa-Typisierung. Einzig bei der Typisierung des Rheinhessen Epidemiestammes zeigte sich eine auffällig hohe Varianz der Spa-Typen im Vergleich zu den Pulsfeldtypen, was uns vor Beendigung dieser Arbeit dazu veranlaßte, alle in der Pulsfeldgelelektrophorese gefundenen Rheinhessen-Epidemiestämme zusätzlich mit der Spa-Typisierung zu charakterisieren.

### 4.2) Clusteranalysen

Die mit Hilfe des BURP-(Based upon repeat pattern-) Algorithmus durchgeführten Clusteranalysen erlaubten die Einteilung der 96 untersuchten Stämme in insgesamt fünf Cluster. Der Algorithmus berücksichtigt Repeatduplikation, Repeatdeletion und zusätzlich Punktmutationen zur Kalkulation der Verwandtschaft verschiedener Spa-Typen (Harmsen et al., Sammeth et al.), wobei die Mitglieder eines Clusters sich durch  $\leq 8$  genetische Ereignisse voneinander unterscheiden durften. Dieses Ergebnis unterstreicht die Hypothese, dass es fünf klonale Linien von MRSA-Epidemiestämmen gibt, die sich weltweit ausbreiten (Robinson et al.), wobei Stämme aus den von mir benannten Clustern Norddeutsch, Süddeutsch/Rheinhessen und EMRSA 16 in Hamburg selten nachweisbar sind. Die Cluster zeigen verglichen mit der Pulsfeldgelelektrophorese insofern keine Abweichung, als dass nach Auswertung mit Hilfe der Tenover-Kriterien (Tenover et al.) in der Pulsfeldgelelektrophorese

verwandte MRSA-Stämme sich auch in der Spa-Typisierung als klonal verwandt und damit einem Cluster zugehörig erweisen. Umgekehrt sind die Grenzen der Auswertbarkeit von Pulsfeldgelelektrophoresemustern bei phylogenetischen Untersuchungen insbesondere bei entfernter verwandten Stämmen offensichtlich, da zwei genetische Ereignisse bereits bis zu sechs unterschiedliche Fragmente bedeuten (Tenover et al.), was bei einer Gesamtdarstellung von ca. 10 Banden pro Pulsfeldlauf die Auswertung nahezu unmöglich macht. Die Spa-Typisierung hingegen eignet sich zur Darstellung von Verwandtschaftsgraden von MRSA-Stämmen unterstützt durch den BURP-Algorithmus der software Ridom staphtype wie auch das ebenfalls sequenzbasierte Multilocus Sequence Typing (MLST) bei identischem Diskriminierungspotential (Koreen et al.), ist dabei aber wesentlich kostengünstiger, da nur ein Genabschnitt statt sieben amplifiziert und sequenziert wird.

#### **4.3) Vor- und Nachteile der Typisierungsmethoden**

Eine Vielzahl von insbesondere genotypischen Typisierungsmethoden zur Klassifizierung von *Staphylococcus aureus*-Stämmen ist durchführbar, wobei insbesondere die bandenbasierten Methoden wie die Pulsfeldgelelektrophorese und die sequenzbasierten Methoden wie das Multilocus Sequence Typing (MLST) und die Spa-Typisierung im Vordergrund stehen (Wichelhaus et al.). Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Methoden der Spa-Typisierung und der Pulsfeldgelelektrophorese unterschieden sich nicht in der Typisierbarkeit, in meinen Untersuchungen waren alle der insgesamt 160 mit beiden Methoden untersuchten Stämme sowohl in der Spa-Typisierung als auch in der Pulsfeldgelelektrophorese typisierbar. Zusätzlich waren auch die 19 Stämme, die lediglich in der Spa-Typisierung eingesetzt wurden (s. 3.7.1: Ausbruch Anfang 2006 mit *Staphylococcus aureus*) zu 100% typisierbar.

#### 4.3.1) Vor- und Nachteile der Spatypisierung

Die Spa-Typisierung als sequenzbasierte Methode hat naheliegende Vorteile, die insbesondere in einer höhergradig standardisierteren (Aires de Sousa et *al.*) und vergleichsweise schnelleren Durchführbarkeit liegen. Die Wahl der Spatypisierung als Typisierungsmethode beschleunigt das Ergebnis im Vergleich zur Pulsfeldgelelektrophorese um ca. 3 Tage, was in Ausbruchssituationen mit den möglichen Konsequenzen wie z.B. einem Aufnahmestopp oder auch einem Mitarbeiterscreening einen erheblichen Zeitgewinn und einen mitunter erheblichen finanziellen Gewinn bedeutet. Je schneller ein Ausbruch als ein solcher erkannt wird und je schneller eine mögliche Verbreitungsquelle gefunden wird, umso schneller kann er gestoppt werden und die Station ggf. wieder für Aufnahmen freigegeben werden

Ein wesentlicher Vorteil ist zudem die Möglichkeit und auch die damit verbundene Eindeutigkeit des Datentransfers von Sequenzierungsergebnissen. Der Austausch von Informationen zwischen Laboratorien in Deutschland aber auch insbesondere weltweit wird wesentlich vereinfacht, eine weltweit einheitliche Nomenklatur der Pulsfeldmuster ist bislang nicht gegeben (van Belkum et *al.*). Die Methode ermöglicht außerdem die Generierung von globalen und lokalen Datenbanken, wie es in Deutschland z. Zt. auf dem server der Fa. Ridom GmbH geschieht (Harmsen et *al.*), die in ihrer Datenbank bislang ca. 3350 Spatypen hinterlegt hat (Stand 01.01.2008) oder auf europäischer Ebene das Projekt SeqNet.org (Friedrich et *al.*). Der Austausch von Informationen zwischen verschiedenen Laboratorien erfordert nicht mehr das Versenden der jeweiligen Stämme, sondern lediglich einen Datentransfer der Sequenzierungsergebnisse.

Ein weiterer Vorteil ist das Ausgangsmaterial. Während für die Pulsfeldgelelektrophorese die Reinkultur zwingend erforderlich ist, sind die sequenzbasierten Methoden theoretisch auch nach Aufreinigung aus primär sterilen Materialien oder aus Geweben möglich, eine kulturelle Anzucht ist nicht zwingend erforderlich.

Ein Nachteil der Methode stellt die bislang noch geringe Größe der Datenbank dar, die in den Fällen eines bislang unbekanntes Spa-Genotyps eine Auswertung und Clusteranalyse über die Repeatmuster nötig macht. Dieser Nachteil wird

allerdings immer weniger ins Gewicht fallen, da diese Datenbanken täglich umfangreicher werden, zu Beginn meiner Arbeit waren ca. 500 verschiedene Spatypen hinterlegt, Anfang 2008 waren es bereits 3350 Spatypen.

Zudem existieren bei der Spa-Typisierung im Gegensatz zur Pulsfeldgelelektrophorese mit den Tenover-Kriterien noch keine klar definierten Kriterien, nach denen der Grad der Verwandtschaft bestimmt wird und die damit eine epidemiologische Interpretation bieten (s.a.4.7).

#### **4.3.2) Vor- und Nachteile der Pulsfeldgelelektrophorese**

Der wesentliche Vorteil der Pulsfeldgelelektrophorese besteht insbesondere in der großen jahrelangen Erfahrung mit einer umfangreichen Datensammlung über insgesamt sechs Jahre am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Demgegenüber stand bislang als sequenzbasierte Methode nur das Multilocus sequence typing (MLST) gegenüber als Methode der Wahl bei epidemiologischen Langzeituntersuchungen. Das MLST stellte sich aber als eine für die Routine zum Beispiel bei der Charakterisierung von Erstnachweisen bei MRSA-Trägern sowie in größeren Ausbruchssituationen viel zu kostenaufwendige Methode dar, da die Auswertung die Sequenzierung von insgesamt sieben Genen einschließt (Enright *et al.*).

Die Pulsfeldgelelektrophorese erwies sich im Vergleich zum MLST als die kostengünstigere Typisierungsmethode bei der routinemäßigen Typisierung von Erstisolaten bei Patienten sowie bei der Fragestellung nach klonaler Identität in Ausbruchssituationen.

Die Nachteile der Pulsfeldgelelektrophorese im Vergleich zur Spa-Typisierung sind der hohe Kosten- und Personalaufwand, die lange Dauer der Untersuchungsmethode von mindestens 5 Tagen, die nicht vorhandene Anwendbarkeit bei phylogenetischen Langzeituntersuchungen, die eingeschränkte Auswertbarkeit bei möglichen zwei genetischen Ereignissen und insbesondere die mangelnde Standardisierbarkeit und damit die Schwierigkeit des nationalen und internationalen Austausches von epidemiologischen Daten (van Belkum *et al.*).

#### 4.4) Vergleich der Verteilung der Spa-Typen mit dem Universitätsklinikum Würzburg

Die Verbreitungsgebiete der verschiedenen Epidemiestämme von MRSA unterscheiden sich bekanntermaßen innerhalb Deutschlands (Witte et al. 2000), es dominieren in Süddeutschland andere MRSA-Stämme, insbesondere der Süddeutsche und der Rheinhessen-Epidemiestamm. Dies legte die Vermutung nahe, dass auch das Verteilungsmuster bei den Spa-Typen stark differiert.

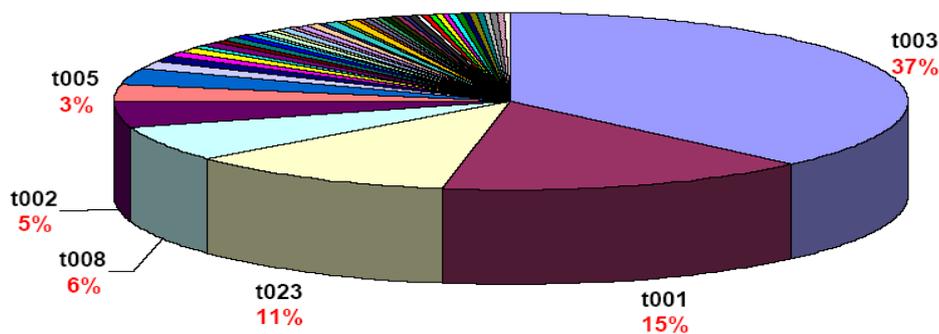


Abb. 3: Verteilung der Spa-Typen am Universitätsklinikum Würzburg (Vogel et al.)

Wie zu erwarten zeigt der Vergleich der Verteilung der Spa-Typen in Hamburg mit der Verteilung am Universitätsklinikum Würzburg (Vogel et al.) eine sehr unterschiedliche Verbreitung bei den jeweils dominierenden MRSA-Epidemiestämmen. Während in unseren Untersuchungen der MRSA-Stämme am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf aus dem Jahre 2004 der Barnimer Epidemiestamm (Spa-Typ t032) mit ca. 50% gefolgt vom Berliner Epidemiestamm (Spa-Typ t004) mit 15% sowie dem Hamburger Epidemiestamm (Spa-Typ t431, klonal verwandt mit t032) mit 10% die höchste Prävalenz aufweisen, dominieren am Universitätsklinikum Würzburg im Jahre 2004 der Rheinhessen Epidemiestamm (Spa-Typ t003) mit 37%, gefolgt vom Süddeutschen Epidemiestamm (Spa-Typ t001) mit 15% und einem klonal mit dem Süddeutschen Epidemiestamm eng verwandten Stamm (Spa-Typ t023 mit der Repeatfolge: r26 r37 r17 r12 r17 r16) sowie dem Norddeutschen Epidemiestamm (Spa-Typ t008) mit 6%. Die bei uns dominierenden Spa-Typen t032 und t004

spielen mit <1% Prävalenz am Universitätsklinikum Würzburg epidemiologisch keine Rolle, umgekehrt weisen die in Würzburg domierenden Stämme t003 und t001 bei uns lediglich Prävalenzraten von 1-2% auf.

Dieser Vergleich zeigt die die sehr unterschiedliche Verbreitung von verschiedenen Epidemiestämmen in verschiedenen Regionen Deutschlands, so daß jede Region die Anwendbarkeit der neuen Methode der Spa-Typisierung für die in dieser Region vorherrschenden Epidemiestämme überprüfen muß.

#### **4.5) Die Spa-Typisierung bei phylogenetischen Langzeituntersuchungen**

Verschiedene Spa-Typen von unterschiedlichen Patienten zeigen ausnahmslos einen ähnlichen Aufbau der repeats mit 24 bp (Ausnahme r 30 mit 27 bp siehe Anhang 5.2).

Die Veränderungen in der Zusammenstellung der repeats verschiedener Spa-Typen ist bedingt durch Deletion oder Duplikation gesamter repeats oder durch Punktmutationen innerhalb von repeats (Brigido et al.). Langzeituntersuchungen bei insgesamt 142 Folgeisolaten von 10 mit *Staphylococcus aureus* langzeitbesiedelten CF-Patienten, ergab eine genetic change rate (Anzahl der Monate der Persistenz von *Staphylococcus aureus* aller Patienten/Anzahl der unabhängigen genetischen Ereignisse) von 70 Monaten, zu einer Deletion oder Duplikation von repeats kam es im Schnitt alle 93 Monate, zu einer Punktmutation im Schnitt alle 280 Monate (Kahl et al.). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Stabilität der X-Region vom Protein A und begründen die Anwendbarkeit der Spa-Typisierung für *Staphylococcus aureus* bei phylogenetischen Langzeituntersuchungen.

#### **4.6) Die Spa-Typisierung in Ausbruchssituationen**

Kann die Spa-Typisierung als Typisierungsmethode verwendet werden, wenn ein mögliches Ausbruchsgeschehen untersucht werden soll?

Die genetische Stabilität der X-Region ermöglicht als Grundvoraussetzung den Einsatz der Spa-Typisierung in Ausbruchssituationen. Je zeitlich begrenzter der

Ausbruch, umso unwahrscheinlicher ist, dass sich unterschiedliche Spa-Typen aufgrund von genetischen Ereignissen begründen, so dass die Spa-Typisierung bei der Aufklärung von möglichen Ausbrüchen eine offensichtlich geeignete Methode ist. In meinen Untersuchungen konnten mit Hilfe der Spa-Typisierung sowohl retrospektiv der stationsübergreifende Ausbruch mit dem phänotypisch auffälligen MRSA-Stamm als auch der Fall der vermehrten Wundinfektion mit *Staphylococcus aureus* aufgeklärt werden, wobei die Spa-Typisierung das Ergebnis zwei bis drei Tage eher liefert, als die konventionelle Pulsfeldgelelektrophorese. Dies kann in einer Ausbruchssituation wertvolle Zeit sein und entsprechende hygienische Maßnahmen können früher eingeleitet werden. Im Falle des stationsübergreifenden Ausbruches konnten retrospektiv zwei Stämme als nicht dem Ausbruch zugehörig identifiziert werden, hier zeigte sich bei der Spa-Typisierung ein größeres Diskriminierungspotential.

#### **4.7) Probleme bei der Auswertung der Spa-Typisierungsergebnisse**

Die Interpretation der Spa-Typisierungsergebnisse insbesondere in Ausbruchssituationen ist nicht unproblematisch, da es im Gegensatz zur Pulsfeldgelelektrophorese noch keine klar definierten Kriterien zur Auswertung und Interpretation von Spa-Typen, die sich in nur einem oder wenigen genetischen Ereignissen voneinander unterscheiden, gibt. Je zeitlich begrenzter der Ausbruch, desto unwahrscheinlicher ist ein genetisches Ereignis, aber es ist auch nicht ausgeschlossen, so dass Stämme, die sich in nur einem genetischen Ereignis voneinander unterscheiden und dadurch unterschiedliche Spatypen bekommen, durchaus klonal identisch und damit Teil eines Ausbruchs sein können. In Ausbruchssituationen ist somit eine Auswertung ausschließlich über die Definition des Spa-Typs nicht ausreichend, hier muss immer ein Vergleich auf der Ebene der Sequenzierungsergebnisse erfolgen und der klonale Verwandtschaftsgrad ermittelt werden.

Ein weiteres Problem stellt sicherlich das große Cluster Süddeutsch/Rheinessen und hierbei insbesondere die klonale Vielfalt des Rheinessen Epidemiestammes mit einer Vielzahl von zum Teil eng verwandten Stämmen dar. Bei einer Ausbruchssituation mit einem Rheinessen Epidemistamm und fraglich klonal

identischen, aber im Spa-Typ differierenden Ergebnissen, sollte ein zweites Typisierungsverfahren, entweder das Multilocus Sequence Typing (MLST) oder alternativ die Pulsfeldgelelektrophorese angewendet werden.

Da die Inzidenz des Rheinhessen Epidemiestammes im Hamburger Raum ca. 1% beträgt, ist diese Konstellation allerdings als sehr unwahrscheinlich anzusehen.

Ein weiteres Problem bei der Interpretation von Typisierungsergebnissen liegt in der besonderen Verteilung der MRSA-Klone im Raum Hamburg, da der Barnimer Epidemiestamm mit einem Anteil von ca. 50% der mit Abstand am häufigsten nachzuweisende MRSA-Epidemiestamm ist und der Nachweis zweier Barnimer Epidemiestämme in einer Ausbruchssituation damit nicht die Übertragung beweist, es könnte sich ebenso um zwei Trägerschaften mit dem Barnimer Epidemiestamm handeln, ohne dass es hier zu einer Übertragung gekommen ist. Das erhoffte Ergebnis, dass mittels der Spatypisierung innerhalb des Barnimer Epidemiestammes feinere Subklassifizierungen und damit ein höheres Diskriminierungspotential möglich sind, hat sich nicht eingestellt, 95% der in der Pulsfeldgelelektrophorese als Barnimer Epidemiestamm identifizierten MRSA-Stämme haben den identischen Spa-Typ t032.

#### **4.8) Einführung der Spa-Typisierung als Typisierungsmethode für *Staphylococcus aureus***

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie ein Abwägen der Vor- und Nachteile beider Methoden zeigten ein vergleichbares Diskriminierungspotential, eine identische Typisierbarkeit sowie Vorteile der Spa-Typisierung bei der Praktikabilität, der Durchführbarkeit, dem Kostenaufwand, bei der Standardisierung und Automatisierung und bei der Geschwindigkeit der Untersuchung. Dies führte zur Umstellung der Typisierung von *Staphylococcus aureus*-Stämmen inklusive der MRSA-Stämme von der bislang als Methode der Wahl geltenden Pulsfeldgelelektrophorese auf das neue, schnellere und kostengünstigere Verfahren der Spa-Typisierung.

Die Spa-Typisierung eignet sich sowohl für die routinemäßige Typisierung und die schnelle Aufklärung der möglichen klonalen Identität in Ausbruchssituationen, als auch aufgrund der genetischen Stabilität der zu

sequenzierenden Region für phylogenetische Langzeituntersuchungen (s. 4.5), diese Methode schafft eine Verbindung zwischen den beiden Anforderungen an eine Typisierungsmethode.

Typisiert werden nun seit 1.1.2006 alle MRSA-Erstisolate zur Übersicht über die epidemiologische MRSA-Situation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf sowie alle Stämme, die gehäuft in epidemiologischem und zeitlichem Zusammenhang stehen und damit möglicherweise Teil eines Ausbruchgeschehens sein könnten.

## 5. Zusammenfassung

Ein am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf wie auch deutschlandweit zunehmendes Problem stellen die methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Isolate dar. Infektionen mit MRSA-Stämmen führen zur erhöhten Morbidität und Mortalität und zu erheblichen Kosten für das Krankenhaus.

„Golden standard“ der Typisierungsmethoden für *Staphylococcus aureus* ist bis 2006 die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Ein 2004 erstmalig beschriebenes Sequenzierungsverfahren, die Typisierung von *Staphylococcus aureus* mit Hilfe des *Staphylococcus aureus* variablen Protein A Gens (*spa*) wurde in dieser Arbeit anhand von 96 regionalen MRSA-Isolaten aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf mit der Pulsfeldgelelektrophorese verglichen. Die Verteilungsmuster bei den 96 untersuchten Stämmen zeigten insgesamt ein vergleichbares Diskriminierungspotential ausgenommen der Rheinhessen Epidemiestamm, der eine auffällig hohe Varianz der Spa-Typen zeigte. Clusteranalysen erlaubten die Einteilung der 96 untersuchten Stämme in insgesamt fünf Cluster. Der Vergleich unserer Ergebnisse mit denen der Universität Würzburg zeigt die sehr unterschiedliche Verbreitung von verschiedenen Epidemiestämmen in verschiedenen Regionen Deutschlands. Retrospektiv wurden ein Ausbruch und im Verlauf eine Häufung von Wundinfektionen mit *Staphylococcus aureus* mit der Methode der Spa-Typisierung untersucht und konnten effektiv bewertet werden.

Ein Abwägen der Vor- und Nachteile beider Methoden führten zur Umstellung der Typisierung von *Staphylococcus aureus*-Stämmen inklusive der MRSA-Stämme von der Pulsfeldgelelektrophorese auf das neue, schnellere und kostengünstigere Verfahren der Spa-Typisierung.

## 6. Referenzen

Aires de Sousa M, Boye K, de Lencastre H, Deplano A, Enright MC, Etienne J, Friedrich A, Harmsen D, Holmes A, Huijsdens W, Kearns M, Mellmann A, Meugnier H, Rasheed JK, Spalburg E, Strommenger B, Struelens MJ, Tenover C, Vogel U, Westh H, Xu J, Witte W (2006) High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J Clin Microbiol* 44: 619-621

Anonymus (1998) Erstes Auftreten von MRSA mit verminderter Glykopeptidresistenz in Deutschland nachgewiesen. *Epid Bull* 17/98:123

Bearman GM, Wenzel RP (2005) Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res* 69:525-534

Bone RC (1994) Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med* 154:26-34

Boyce JM, Medieros AA, Papa EF, O'Gara CJ (1990) Induction of beta-lactamase and methicillin resistance in unusual strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 25:37-81

Boyle MDP (1990) in *Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins*, ed. Boyle. 1:17-28

Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G (1994) *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 7. Auflage:350-351. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena-New York

Brigido MD, Barardi CR, Bonjardin CA, Santos CL, Junquiera ML, Brentani RR (1991) Nucleotide sequence of a variant protein A of *Staphylococcus aureus* suggests molecular heterogeneity among strains. *J Basic Microbiol* 31:337-345

Brumfitt W, Hamilton-Miller J (1989) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 320:1188-1196

Casewell MW, Hill RLR (1986) The carrier state: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 18:1-12

Centers of Disease Control (2002) Staphylococcus aureus resistant to vancomycin-United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 51:565-567

Centers of Disease Control (2003) Outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections-Los Angeles County, California, 2002-2003. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 52:88

Chambers HE, Korzeniewski OM, Sande MA (1983) *Staphylococcus aureus* endocarditis: clinical manifestations in addicts and nonaddicts. Med (Baltimore) 62:170-177

Chaix C, Durand-Zaleski I, Alberti C, Brun-Buisson C (1999) Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a cost-benefit analysis in an intensive care unit. JAMA 282:1745-1751

Chesney PJ, Davis JP, Purdy WK, Wand PJ, Chesney KW (1981) Clinical manifestations of toxic shock syndrome. JAMA 246:741-748

Cribier B, Prevost G, Couppic P, Finck-Barbencon V, Grosshans E, Piemont Y (1992) Staphylococcus aureus leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. Dermatology 185:175-180

Easmon CSF, Adlam C (1983) Staphylococci and Staphylococcal Infections. Acad Press London-New York

Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG (2000) Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 38(3):1008-1115

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci USA 99(11):7687-7692

European Antibiotic Resistance Surveillance System (2002) Annual Report 2002. <http://www.ear.ss.rivm.nl/Pagina/DOC/rep2002/annual-report-2002.pdf>. Cited Dec 2004

Feil How clonal is St. Koreen 11

Flock SI, Fröman G, Jonsson K, Guss B, Signas C, Nilsson B, Raucci G, Höök M, Wadstrom T, Lindberg M (1987) Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. EMBO J 6:2351-2357

Fröman G, Switalski LM, Speziale P, Höök M (1987) Isolation and characterization of a fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 262:6564-6571

Franklin D, Lowy MD (1998) *Staphylococcus Aureus* Infections. N Engl J Med 339(8):520-532

Frénay HME, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Verhoef J, Mooi FR (1996) Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* on the Basis of Protein A Gene Polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 15:60-64

Friedrich A, Witte W, Harmsen D, de Lencastre H, Hryniewicz W, Scheres J, Westh H (2006) SeqNet.org: a European laboratory network for sequence-based typing of microbial pathogens. Euro Surveill 11

Geipel U, Herrmann M (2005) Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*; Resistenztypen und klinische Konsequenzen. Anaesthes 54:155-162

Graille M, Stura EA, Corper AI, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB, Silverman GJ (2000) Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. PNAS 97:5399-5404

Guss B, Uhlen M, Nilsson B, Lindberg M, Sjoquist J, Sjodahl J (1984) Region X, the cell-wall-attachment part of *staphylococcus aureus* protein A. Eur J Biochem 138:413-420

Hackbarth CJ, Chambers HF (1989) Methicillin-resistant staphylococci: detection methods and treatment of infection. Antimicrob Agents Chemother 33:995-999

Hahn H, Falke D, Kaufmann HE, Ullmann U (1999) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 3. Auflage:199-211. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Harberth S, Francois P, Schrenzel J, Fankhauser-Rodriguez C, Ilugonnet S, Koessler T (2005) Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 11:962-965

Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Turnwald D, Vogel U (2003) Typing of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using a novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol 41:5442-5448

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 9(10):486-493

Hiramatsu K, Hanaki H, Ito T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC (1997) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 40:135-136

Jevons PM (1961) Celbenin resistant staphylococci. Brit Med J 1:124-125

Jorgensen JH, Redding JS, Maher LA, Ramirex PE (1988) Salt-supplemented medium for testing methicillin-resistant staphylococci with newer beta-lactams. J Clin Microbiol 26:1675-1678

Kahl BC, Mellmann A, Deiwick S, Peters G, Harmsen D (2005) Variation of the Polymorphic Region X of the Protein A Gene during Persistent Airway Infection of Cystic Fibrosis Patients Reflects Two Independent Mechanisms of Genetic Change in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 43(1):502-505

Klimek JJ, Marsik FJ, Bartlett RC, weir B, Shea P, Quintiliani R (1976) Clinical, epidemiologic, and bacteriologic observations of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a large community hospital, Am J Med 61:340-345

Kluytmans JAJW, Mouton JW, Ijzerman FPF (1995) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is a major risk for wound infection after cardiac surgery. J Infect Dis 171:216-219

Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN (2004) spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker to Detect Genetic Micro- and Macrovariation. J Clin Microbiol 42(2):792-799

Kresken M, Hafner D, Schmitz F, Wichelhaus T (2003) Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland

Liljequist B, Ransjo U, Coombes G, Cookson B (2003) Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and Its application for Tracing the Spread of Related Strains. J Clin Microbiol 41(4):1574-1585

Linde H, Wagenlehner F, Strommenger B, Drubel I, Tanzer J, Reischl U, Raab U, Holler C, Naber KG, Witte W, Hanses F, Salzberger B, Lehn N (2005) Healthcare-associated outbreaks and community-acquired infection due to MRSA carrying the Panton-Valentine leukocidin gene in southeastern Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:419-422

Marrack P, Kappler J (1990) The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248:705-711

Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, Kauffman CA, Yu VL (1993) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Consensus Review of the Microbiology, Pathogenesis, and Epidemiology With Implications for Prevention and Management. *Am J Med* 94:313-328

Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Elsberg Zinn C, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Lachoncha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Noble WC, Valkenburg HA, Wolters CHL (1967) Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J Hyg* 65:567-578

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC (1995) Manual of clinical microbiology: 190-208

Olive DM, Bean P (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37:1661-1669

Panlilio A, Culver DH, Gaynes RP et al. (1992) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol* 13:582-586

Peacock JE, Marsik FJ, Wenzel RP (1980) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction and spread within a hospital. *Ann Intern Med* 93:526-532

Prevost G, Pottecher B, Dahlet M, Bientz M (1991) Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 17:255-269

Pujol M, Pena C, Pallares R, Ariza J, Ayats J, Dominguez MA, Gudiol F (1996) Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am J Med* 100:509-516

Robinson DA, Enright MC (2003) Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(12):3926-3934

Salgado CD, Farr BM, Calfee DP (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a metaanalysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* 36:131-139

Sammeth M, Weniger W, Harmsen D, Stoye J (2006) Alignment of tandem repeats with excision, duplication, substitution and indels (EDSI) Proceedings of the 5th workshop on algorithms in bioinformatics:276-290 Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Cell* 37:67-75.

Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dogde DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN (1999) Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains. *J Clin Microbiol* 37:3556-3563

Shopsin B, Kreiswirth BN (2001) Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 7(2):323-326

Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A (1999) The development of vancomycin resistance in an patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med* 340:517-523

Steinberg JP, Clark CC, Hackman BO (1996) Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: Impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin Infect Dis* 23: 255-259

Tenover FC, Arbeit R, Goering R (1997) How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A review for Healthcare Epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18:426-439

Tenover FC, Arbeit R, Goering R, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-2239

Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J (1994) Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 32: 407-415

Tiemersma EW, Bronzwaer S, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundmann H and European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants (2004) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis* 10:1627-1634

Uhlen M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M (1984) Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A: A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem* 259:1695-1702

Van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, Goering R, Tenover F, Steward C, O'Brian F, Grubb W, Tassios P, Legakis N, Morvan A, El Solh N, de Ryck R, Struelens M, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J,

Kooistra M, Talens A, Witte W, Verbrugh H (1998) Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *SmaI* macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 36:1653-1659

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60:407-438

Vogel U, Kursai O, Claus H, Knaust A, Pitten FA (2005) Spa-Typisierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen am Universitätsklinikum Würzburg, *Der Mikrobiologe* 15.Jg: 131-166

Ward TT, Winn RE, Hartstein AI, Sewell DL (1981) Observations relating to an inter-hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of antimicrobial therapy in infection control. *Infect Control* 2:453-459

Weber S, Pfaller MA, Herwaldt LA (1997) Role of molecular epidemiology in infection control. *Inf Dis Clin North Am* 11:257-278

Weinke T, Schiller R, Fehrenbach FJ, Pohle HD (1992) Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 985-989

Wenzel RP, Peri TM (1995) The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. *J Hosp Infect* 31:13-24

Whitby M, McLaws ML, Berry G (2001) Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Med J Aust* 175:264-267

Wichelhaus TA, Schäfer V, Brade V (2000) Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. Chem J 2:93-98

Witte W, Nationales Referenzzentrum für Staphylokokken am Robert-Koch-Institut (2004) Community acquired MRSA weltweit und in Deutschland. Epidemiol Bull 2004:33-36

Witte W, Heuck D, Braulke C (2000) Tätigkeitsbericht des Nationalen Referenzzentrums für Staphylokokken im Jahr 1999. Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 43 (8): 633-638.

## 7.) Anhang

### 7.1) Tabellarische Übersicht der identifizierten Spatypen

t001: r26 r30 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17 r16  
t002: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17 r16  
t003: r26 r17 r20 r17 r12 r17 r17 r16  
t004: r09 r02 r16 r13 r13 r17 r34 r16 r34  
t008: r11 r19 r12 r21 r17 r34 r24 r34 r22 r25  
t012: r15 r12 r16 r02 r16 r02 r25 r17 r24 r24  
t015: r08 r16 r02 r16 r34 r13 r17 r34 r16 r34  
t018: r15 r12 r16 r02 r16 r02 r25 r17 r24 r24 r24  
t021: r15 r12 r16 r02 r16 r02 r25 r17 r24  
t022: r26 r23 r13 r23 r31 r29 r17 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r16 r28  
t030: r15 r12 r16 r02 r24 r24  
t032: r26 r23 r23 r13 r23 r31 r29 r17 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r16 r28  
t041: r26 r30 r17 r34 r17 r20 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17 r16  
t050: r08 r16 r02 r16 r34 r34 r17 r34 r16 r34  
t065: r09 r02 r16 r34 r13 r17 r34 r16 r34  
t067: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r12 r17  
t068: r11 r19 r19 r12 r21 r17 r34 r24 r34 r22 r25  
t078: r04 r21 r12 r41 r20 r17 r12 r12 r17  
t084: r07 r23 r12 r34 r34 r12 r12 r23 r02 r12 r23  
t094: r07 r23 r12 r34 r34 r12 r12 r23  
t105: r26 r23 r17 r34 r17 r20 r17 r17 r17 r16  
t110: r26 r30 r17 r12 r17 r16  
t153: r04 r44 r33 r31 r12 r16 r34 r16 r12 r33 r34  
t156: r07 r23 r12 r33 r22 r17  
t163: r04 r20 r17 r20 r17 r45 r16 r34  
t166: r04 r44 r33 r21 r12 r16 r34 r16 r12 r25 r22 34  
t216: r04 r20 r17 r20 r17 r31 r16 r34  
t242: r26 r23 r17 r13 r17 r20 r17 r12 r17 r16  
t266: r09 r02 r16 r13 r13 r13 r17 r34 r16 r34  
t305: r11 r12 r21 r17 r34 r24 r34 r24 r34 r22 r25

t431: r26 r23 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r25 r16 r28  
t1436: r26 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r25 r16 r28  
t1447: r15 r12 r23 r16 r02 r25  
t1448: r08 r21 r17 r34 r24 r34 r22 r24 r34 r22 r33 r25  
t1480: r09 r34 r42 r17 r34 r16 r34  
t1482: r07 r12 r34 r34 r34 r12 r23 r02 r12 r23  
t1525: r04 r20 r17 r12 r17 r17  
t1546: r07 r23 r12 r34 r34 r66 r12 r12 r12 r23 r02 r12 r23

## 7.2) Tabellarische Übersicht der Sequenzen der gefundenen repeats

r02: AAA GAA GAC AAC AAA AAA CCT GGT  
r04: GAG GAA GAC AAT AAC AAG CCT GGT  
r07: GAG GAA GAC AAC AAC AAA CCT GGT  
r08: GAG GAA GAC AAC AAC AAG CCT GGT  
r09: GAG GAA GAC GGC AAC AAA CCT GGT  
r11: GAG GAA GAC AAT AAC AAG CCT GGC  
r12: AAA GAA GAC AAC AAC AAG CCT GGT  
r13: AAA GAA GAC AAC AAC AAA CCT GGT  
r15: GAG GAA GAC AAC AAC AAG CCT GGC  
r16: AAA GAA GAC GGC AAC AAA CCT GGT  
r17: AAA GAA GAC GGC AAC AAG CCT GGT  
r19: AAA GAA GAC AAT AAC AAG CCT GGC  
r20: AAA GAA GAC AAC AAC AAA CCT GGC  
r21: AAA GAA GAC AAC AAC AAG CCT GGC  
r22: AAA GAA GAC GGC AAC AAG CCT GGC  
r23: AAA GAA GAC GGC AAC AAA CCT GGC  
r24: AAA GAA GAT GGC AAC AAG CCT GGT  
r25: AAA GAA GAT GGC AAC AAA CCT GGT  
r26: GAG GAA GAC AAC AAA AAA CCT GGT  
r28: AAA GAA GAT GGT AAC AAA CCT GGC  
r29: AAA GAA GAC AAC AAA AAG CCT AGC  
r30: AAA GAA GAC GGC AAC AAA AAA CCT GGT

r31: AAA GAA GAT GGC AAC AAA CCT GGC  
r33: AAA GAA GAT GGC AAC AAG CCT GGC  
r34: AAA GAA GAC AAC AAA AAA CCT GGT  
r41: CAA GAA GAC GGC AAC AAG CCT GGT  
r42: AAA GAA GAC AAC ATC AAA CCT GGT  
r44: AAA GAA GAC AAC AAG CCT GGT  
r45: AAA GAA GAT GGC AAC AGA CCT GGC  
r66: AAA GAA GAC AGC AAC AAG CCT GGT

### **7.3) Übersicht über identifizierte Pulsfeldgelelektrophoresemuster**

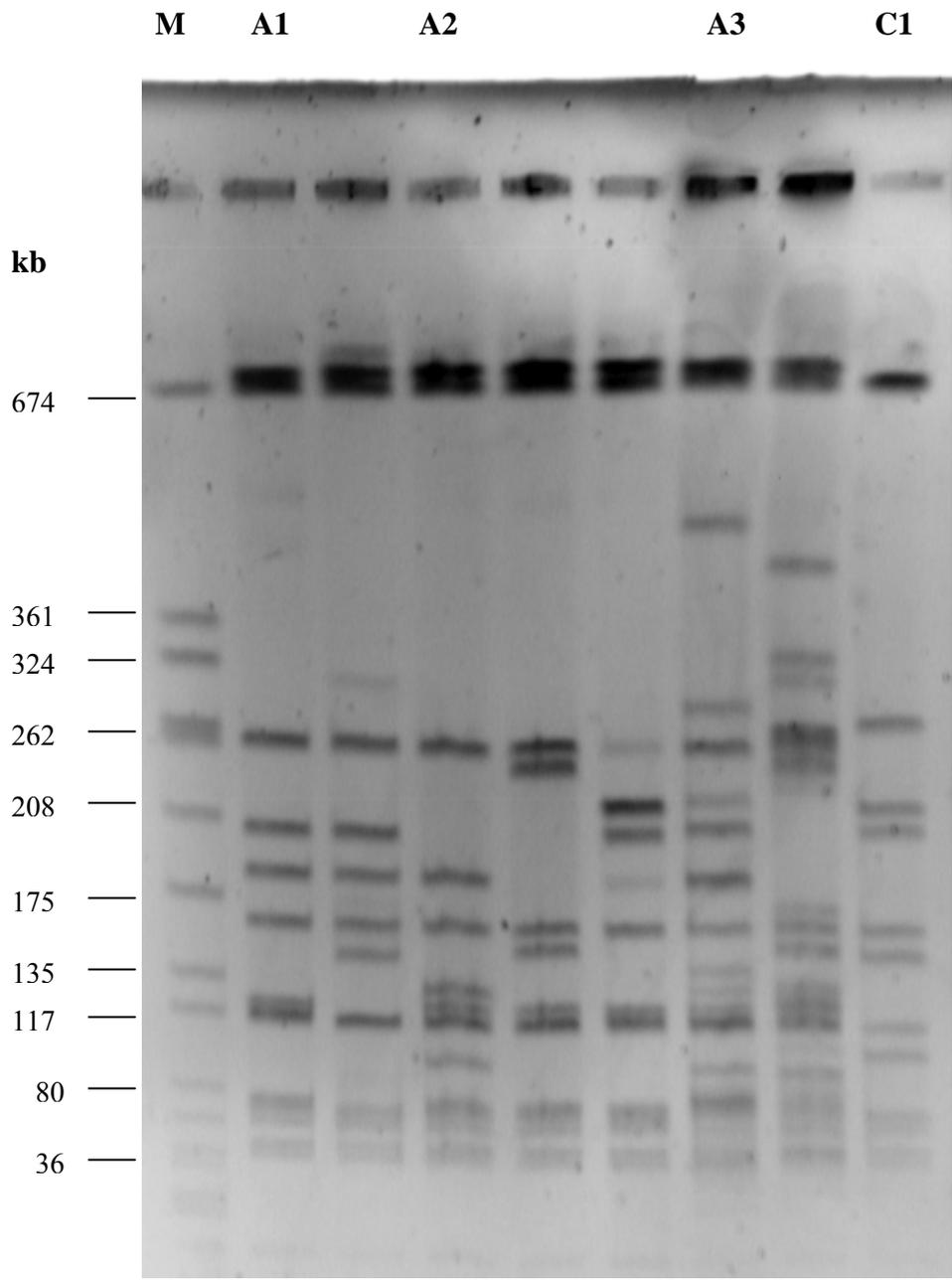


Abb.4: Pulsfeldmuster A1, A2, A3 und C1

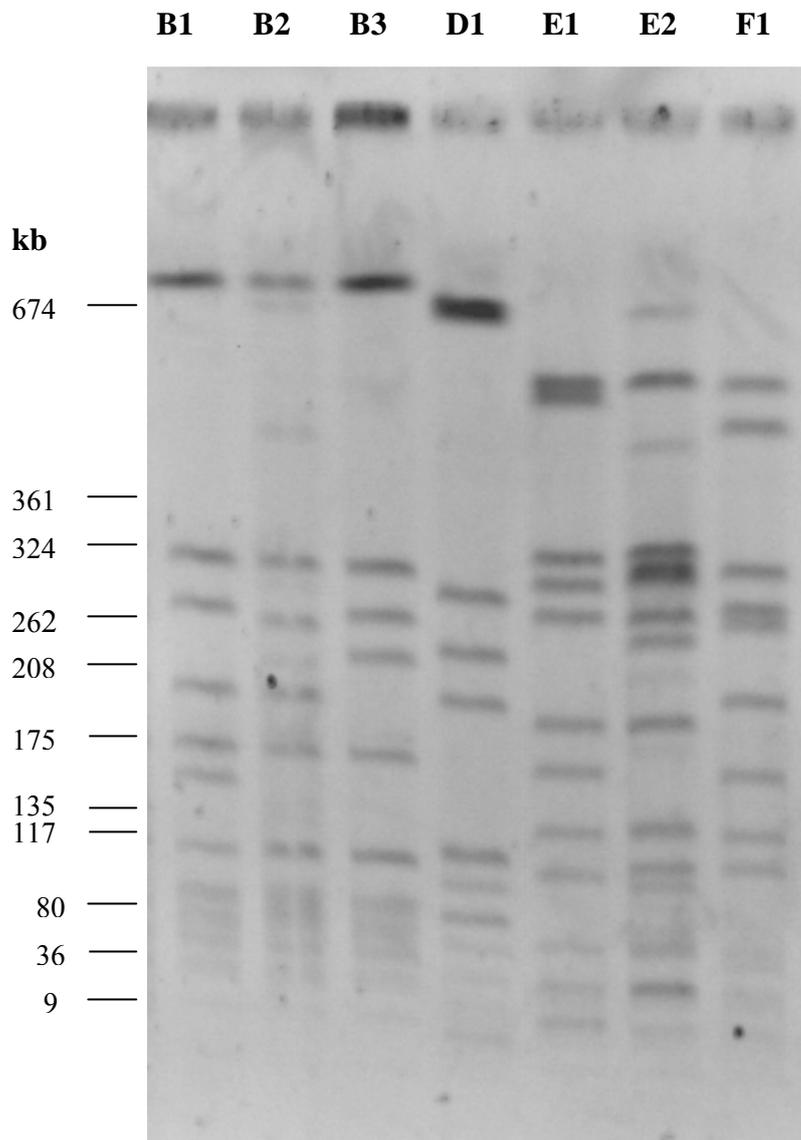


Abb. 5: Pulsfeldmuster B1, B2, B3, D1, E1, E2 und F1

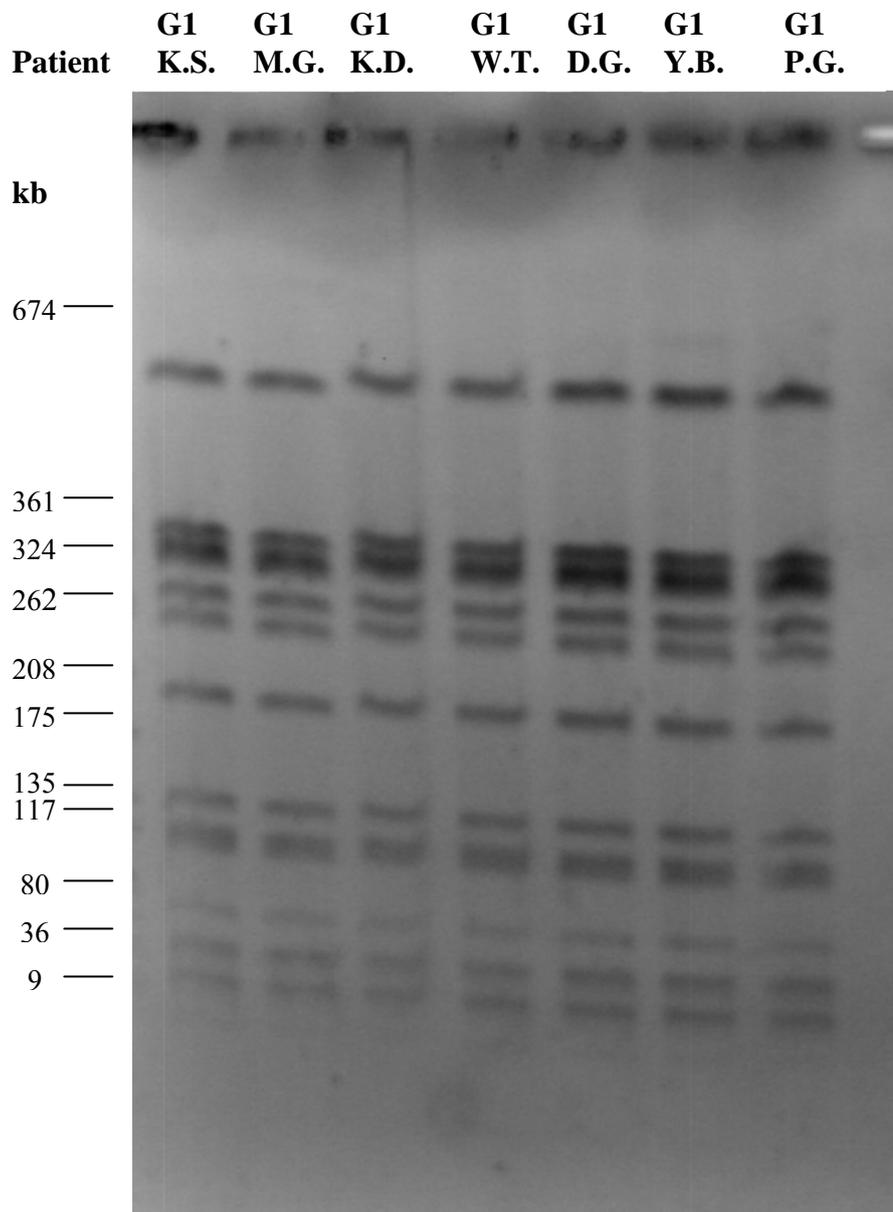


Abb. 6: Ausbruch weißer MRSA: Pulsfeldmuster 7 Patienten mit Initialen, entspricht Pulsfeldmuster G1.

	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>	<b>G1</b>
<b>Patient</b>	<b>I.W</b>	<b>M.K.</b>	<b>T.B</b>	<b>M.N.</b>	<b>P.F.</b>	<b>E.P</b>	<b>W.M.</b>	<b>A.M.</b>	<b>N.C.</b>	<b>H.R.</b>	<b>Z.G</b>	<b>T.K..</b>	<b>S.H.</b>

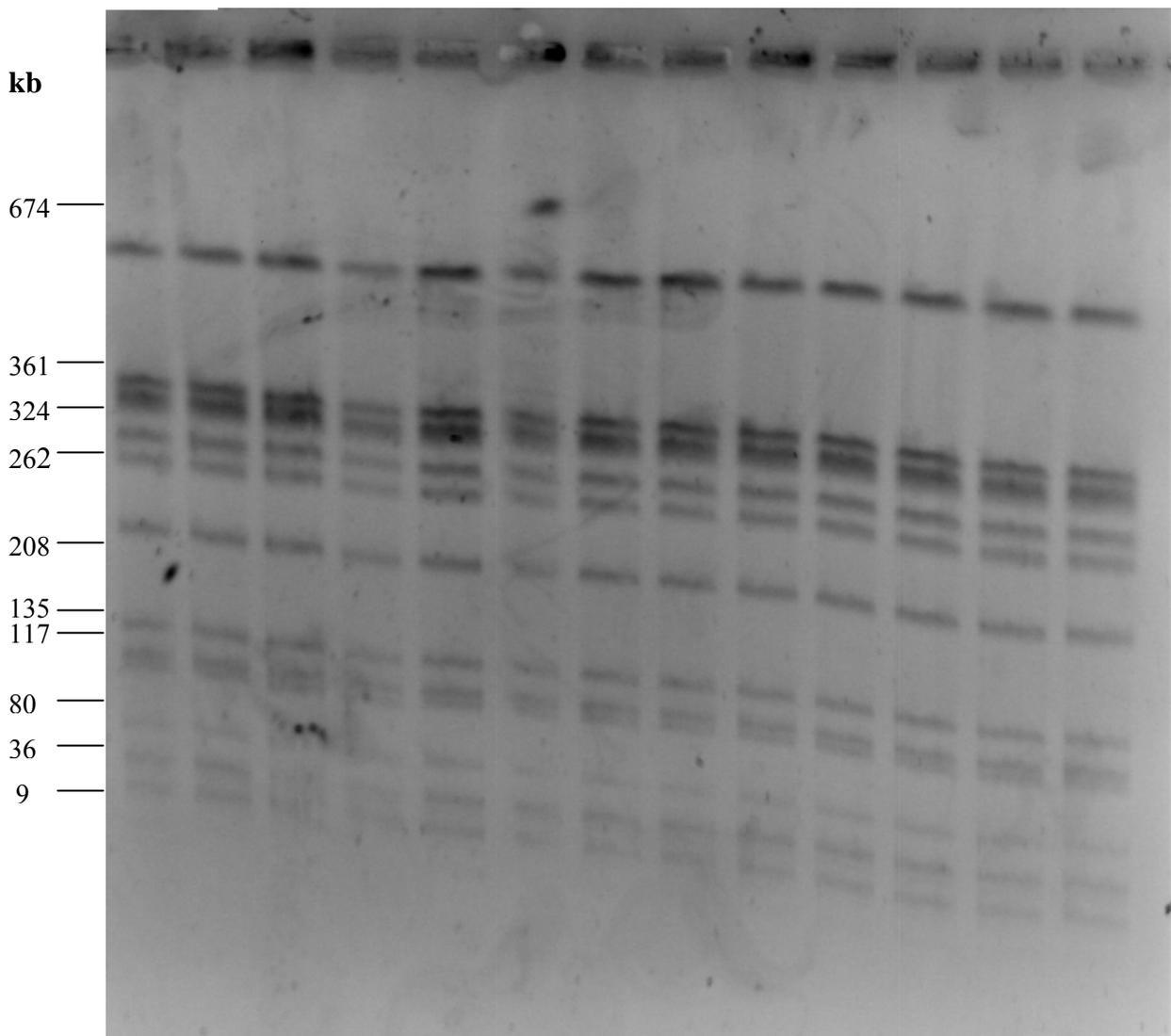


Abb. 7: Ausbruch weißer MRSA: Pulsfeldmuster 13 Patienten mit Initialen, entspricht Pulsfeldmuster G1.

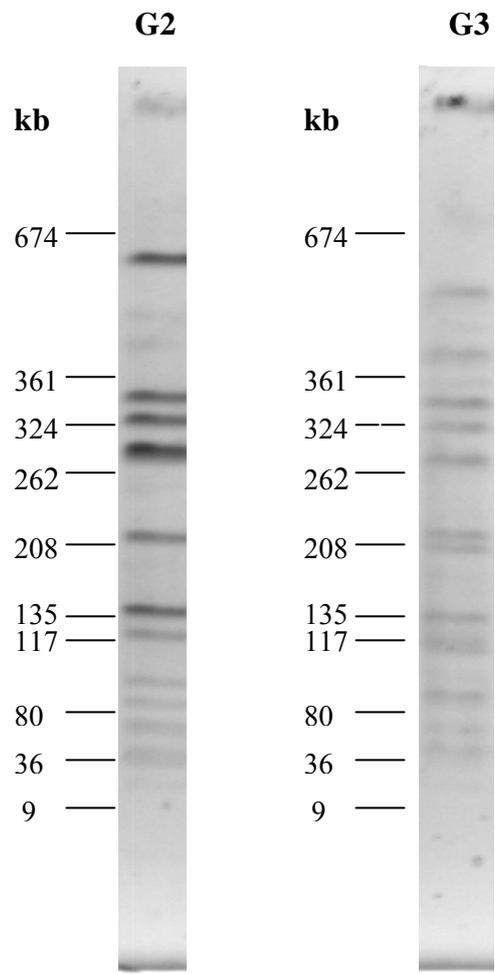


Abb. 8: Pulsfeldmuster G2 und G3

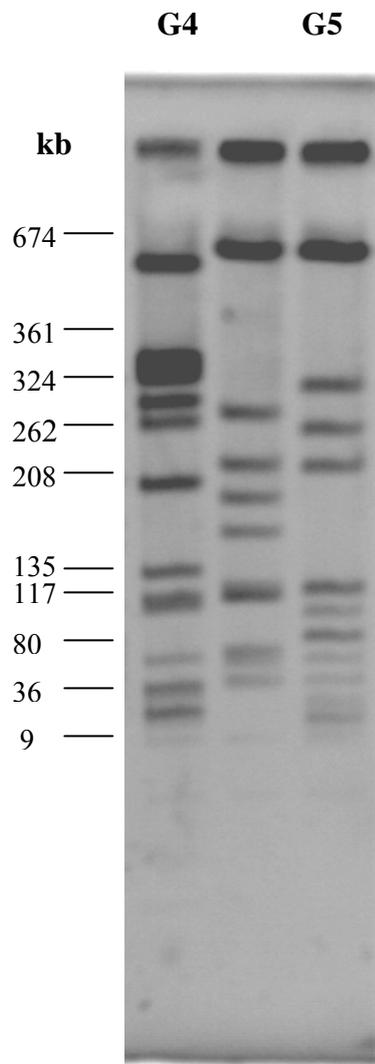


Abb. 9: Pulsfeldmuster G4 und G5

## 8.) Abkürzungen

AFLP	Amplified fragment length polymorphism
bid.	Bidestillata
bp	Basenpaare
BURP	Based upon repeat pattern
bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
CA	Community-acquired
CF	Zystische Fibrose (cystic fibrosis).
Cm	Centimeter
c-MRSA	Community-acquired MRSA
dest.	Destilliert
d.h.	Das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
ES	EDTA Sarkosin
ESP	EDTA Sarkosin Proteinase
ESβL	Extended spectrum β-Lactamase
Fa.	Firma
Fc	Fragment crystallizable
Fnbp	Fibronectin-bindendes Protein
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	High pressure liquid chromatography
kB	Kilobasen
konz.	Konzentriert
kD	Kilodalton
L	Liter
LMP	Low melting point
M	Mol
m	Meter
MHC	Major histocompatibility complex
μ	Mikro

min.	Minute
MLEE	Multilocus enzyme electrophoresis
MLST	Multilocus sequence typing
mm	Millimeter
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NCTC	National Collection of Type Cultures
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
R	Repeat
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
REA	Restriction endonuclease analysis
Rep	Repetitive
RFLP	Restriktions-Fragment- Längenpolymorphismus
rpm	Rotation per minutes
s	Sekunde
s.	Siehe
s.a.	Siehe auch
SCC	Staphylococcus Cassette Chromosome
SSSS	Staphylococcus scalded scin syndrome
Spa	<i>Staphylococcus aureus</i> -Protein A
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Bor EDTA
TE	Tris EDTA
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
TSS	Toxic Shock Syndrome
TSST	Toxic Shock Syndrome-Toxin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt

VRE

z.B.

Vancomycin-resistente Enterokokken

Zum Beispiel

## **9.) Danksagung**

Ich möchte im Rahmen dieser Dissertationsschrift die Gelegenheit nutzen, mich bei all denen zu bedanken, die mich in dieser Zeit beruflich und privat begleitet haben:

Herrn Prof. Dr. Kaulfers danke ich für die von ihm geschaffenen Möglichkeiten, zur Durchführung der Experimente, für seine Bereitschaft, meine Arbeit zu lesen und für die kritischen Anmerkungen und Korrekturen.

Ich danke den MTA's Petra Schillemeit, Silke Meyer und Stephanie Freund für die praktische Unterstützung bei der Umsetzung aller Methoden sowie allen Kollegen aus dem Institut für med. Mikrobiologie, Virologie und Krankenhaushygiene, die mir die Zeit durch kollegiale Hilfsbereitschaft und eine humorvolle Atmosphäre verschönert haben.

Privat danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und Joachim und allen meinen Freunden für ihre liebevolle Unterstützung.

# Lebenslauf

Stefanie Scherpe  
Geb. 12.08.1975 in Stade

## Hochschulausbildung:

- Studienbeginn WS 95/96 in Hamburg
- Ärztliche Vorprüfung 09/97
- Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung 09/98
- English for Medicine am Zentralen Fremdspracheninstitut Hamburg im SS 99
- Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 03/01
- Praktisches Jahr von 10/01 bis 08/02
- Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 12/02
- Ärztin im Praktikum von 01/03 bis 06/04 am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

## Ärztliche Weiterbildung:

- Seit 07/04 Ärztin in Weiterbildung am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

## Praktische Tätigkeit:

- Krankenpflegepraktikum 05/95 bis 07/95
- Famulatur Innere Medizin am Krankenhaus „Mariahilf“ 08/98 bis 09/98
- Famulatur Radiologie am Kreiskrankenhaus Buxtehude 02/99 bis 03/99
- Famulatur Molekularbiologie am ZMNH 07/99 bis 08/99
- Famulatur Innere Medizin am Krankenhaus „Elim“ 09/99
- Famulatur Pathologie im Allgemeinen Krankenhaus Barmbek 10/99
- Praktisches Jahr:
  - 1.Tertial: Chirurgie im Allgemeinen Krankenhaus Barmbek von 10/01 bis 02/02
  - 2.Tertial: Innere Medizin im Albertinen-Krankenhaus von 02/02 bis 06/02
  - 3.Tertial: Mikrobiologie im UKE von 06/02 bis 08/02

## Schulbildung:

- Grundschule am Stieglitzweg Buxtehude 1982-1986
- Orientierungsstufe Buxtehude-Süd 1986-1988
- Gymnasium Buxtehude-Süd 1988-1992
- Halepaghen-Schule Buxtehude 1992-1995 mit Abitur 1995