Aus dem Institut
für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
des Zentrums für Diagnostische Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. M. Aepfelbacher

Molekulare Charakterisierung Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Isolate

Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Manuel Wolters
aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 13.07.2009
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. P.-M. Kaulfers
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. J. Knobloch
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Dr. H. Rohde

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung 1
1.1 *Staphylococcus aureus*.....1
1.2 Durch *Staphylococcus aureus* hervorgerufene Erkrankungen 1
1.3 Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*: Resistenzmechanismen und Epidemiologie....3
1.4 Molekularbiologische Typisierungsverfahren für MRSA.....5
1.5 Zielsetzung der Arbeit 15
2. Material und Methoden 17
2.1 Material.....17
2.1.1 Geräte 17
2.1.2 Chemikalien.....17
2.1.3 Medien.....18
2.1.4 Reagenzien und Enzyme 18
2.1.5 Primer 19
2.1.5 Isolate 19
2.2 Methoden.....20
2.2.1 Anzucht der Kulturen 20
2.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese.....20
2.2.3 Extraktion der bakteriellen DNA.....23
2.2.4 Amplifikation der DNA.....24
2.2.5 Agarosegelelektrophorese 25
2.2.6 Aufreinigung des Amplifikats 26
2.2.7 DNA - Sequenzanalyse.....27
3. Ergebnisse.....28
3.1 Langzeitverläufe 28
3.1.1 PFGE 28
3.1.2 *spa*-Typisierung.....31
3.2 In Hamburg endemische Klone 32
3.2.1 PFGE 32
3.2.2 *spa*-Typisierung.....37

3.3 Sporadische Isolate 44
3.3.1 PFGE, *spa*-Typisierung und MLST 44
4. Diskussion 52
5. Zusammenfassung 59
6. Literaturverzeichnis 61
7. Anhang 70
7.1 Tabellarische Übersicht über die untersuchten Isolate 70
7.2 Tabellarische Übersicht über die gefundenen *spa*-Typen 74
7.3 Abbildungsverzeichnis 75
7.4 Tabellenverzeichnis 76
8. Abkürzungen 77
9. Danksagung 79
10. Lebenslauf 80

1. Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus*

Die Familie der *Micrococcaceae* umfasst die Gattungen *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus* und *Staphylococcus*. Anhand genetischer, physiologischer, biochemischer und morphologischer Aspekte werden innerhalb der Gattung *Staphylococcus* derzeit etwa 65 Spezies und Subspezies differenziert (www.bacterio.cict.fr, www.dsmz.de), von denen 16 beim Menschen gefunden werden. Die Vertreter dieser Gattung sind gram-positive, fakultativ anaerobe, unbewegliche, nicht sporenbildende Kokkenbakterien, die Katalase-Aktivität exprimieren und als einzelne Zelle, in traubenartigen Haufen oder in kurzen Ketten vorliegen [48]. Weiter lassen sich Staphylokokken durch den Nachweis der Prothrombin-aktivierenden Koagulase in koagulasepositive und koagulasenegative Arten unterteilen [84]. Die wichtigste humanpathogene, koagulasepositive Art ist *Staphylococcus aureus* [49].

1.2 Durch *Staphylococcus aureus* hervorgerufene Erkrankungen

Staphylococcus aureus kann eine große Vielfalt unterschiedlicher Erkrankungen hervorrufen. Diese reichen von relativ gutartigen Hautinfektionen wie Impetigo follicularis, Furunkeln und Karbunkeln bis hin zu lebensbedrohlichen Zuständen, wie dem Erysipel, tiefen Abszessen, Osteomyelitis, Pneumonie, Sepsis und Endokarditis [55]. Neben diesen invasiven Erkrankungen ist *S. aureus* auch für eine Reihe toxinbedingter Krankheitsbilder verantwortlich [19, 58]. Die hierbei relevanten Toxine können entweder von Stämmen produziert werden, die durch die Kolonisation von Haut oder Schleimhäuten in direktem Kontakt zu ihrem Wirt stehen, wie es beim staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) [51] und dem toxic shock syndrome (TSS) [15, 60, 77] der Fall ist oder indirekt über die Nahrung in den Wirt gelangen, wie bei den durch *S. aureus* verursachten Lebensmittelvergiftungen [5].

Eine besonders große Bedeutung hat *S. aureus* als Erreger nosokomialer Infektionen. So wurde *S. aureus* anhand von Daten des NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System) zusammen mit *Escherichia coli* (je 12 % von 70411 Fällen) als häufigster Erreger nosokomialer Infektionen identifiziert. Bezogen auf chirurgische Wundinfektionen stellt *S. aureus* mit 19 % den häufigsten Erreger dar [22].

Auch bei nosokomial erworbenen Pneumonien wird *S. aureus* in 20 % bis 30 % der Fälle als Erreger nachgewiesen [41, 56], während er im ambulanten Bereich für weniger als 10 % der Pneumonien verantwortlich ist [73]. Obwohl es sich bei der durch *S. aureus* hervorgerufenen Pneumonie typischerweise um eine nekrotisierende Infektion mit rasch fortschreitender Gewebezerstörung handelt, ist ihr klinisches Bild häufig nicht von Pneumonien, die durch andere Erreger bedingt sind, zu unterscheiden [67]. Eine Sonderform mit besonders schlechter Prognose stellt die durch Panton-Valentine-Leukocidin (PVL) - positive *S. aureus*-Stämme bedingte Pneumonie dar. Sie tritt vor allem bei gesunden Kindern und jungen Erwachsenen auf und geht mit einer hohen Letalität einher [21, 53, 54]. Eine gefürchtete Komplikation der *S. aureus*-Pneumonie ist das Pleuraempyem. Auch bei diesem Krankheitsbild ist *S. aureus* für etwa ein Drittel aller Fälle verantwortlich und damit der häufigste Erreger [11].

Eine gefürchtete Folge lokaler *S. aureus*-Infektionen ist die Bakteriämie, da sie zur Entstehung septischer Metastasen in praktisch allen Organen führen kann [53] und mit einer Mortalität zwischen 10 % und 20 % assoziiert ist [52, 68]. Auch für dieses Krankheitsbild wurde *S. aureus* neben den koagulasenegativen Staphylokokken als einer der häufigsten Erreger identifiziert [59, 99]. Eine häufige Komplikation der *S. aureus* - Bakteriämie ist die Endokarditis [6, 8]. Besonders Patienten mit künstlichen Herzklappen haben ein großes Risiko eine Endokarditis als Folge einer Bakteriämie zu entwickeln [26]. In einer Studie wurde gezeigt, dass die *S. aureus*-Bakteriämie auch bei herzgesunden Patienten in bis zu 13 % eine Endokarditis zur Folge hat [34].

Die durch *S. aureus* verursachte Endokarditis nimmt typischerweise einen akuten Verlauf, welcher mit Klappendestruktion, septischen Emboli und kardiogenem sowie septischem Schock einhergehen kann [13, 67]. Die Inzidenz dieser Erkrankung ist in den vergangenen 20 Jahren trotz verbesserter medizinischer Versorgung konstant geblieben. Die Ursache dieser Konstanz ist in einem Wandel der betroffenen Hauptrisikogruppen zu sehen. Während früher hauptsächlich Patienten mit geschädigten Herzklappen aufgrund rheumatischen Fiebers betroffen wahren, stellen heute intravenös Drogenabhängige, Patienten mit Gefäßprothesen, alte Patienten mit sklerotisch veränderten Herzklappen und Dialysepatienten die Hauptrisikogruppen dar [2].

1.3 Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*: Resistenzmechanismen und Epidemiologie

Schon 1944 zeigten einige *Staphylococcus aureus*-Stämme eine erworbene Resistenz gegen Penicillin. Diese Resistenz beruht auf der Bildung von Penicillinasen, welche durch das auf einem Plasmid lokalisierte *bla*-Gen kodiert werden. Penicillinasen hydrolisieren Penicillin und andere penicillinaseempfindliche β-Laktamantibiotika zu inaktiven Penicillinsäuren [30]. Heute wird der Anteil dieser Isolate, deren Penicillinresistenz auf der Bildung von Penicillinasen beruht, auf 80 % geschätzt. Bereits ein Jahr nach der Einführung des Methicillins, dem Prototyp der penicillinasefesten Penicilline im Jahr 1960, wurden die ersten Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) -Stämme isoliert [29]. Der für die Entstehung der Methicillinresistenz von *S. aureus* ursächliche Mechanismus führte zu einer Resistenz gegenüber allen zur Gruppe der β-Laktamantibiotika gehörigen Substanzen (Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Monobactame). Dieser Resistenzmechanismus beruht auf der Produktion eines veränderten Penicillin-bindenden Proteins (PBP), welches sich durch eine sehr niedrige Affinität zu Methicillin und den meisten anderen β-Laktamantibiotika auszeichnet und in der veränderten Form als PBP2a bezeichnet wird [12]. Diese über das PBP2a vermittelte Resistenz wird als intrinsische Resistenz bezeichnet. [4]. Das PBP2a wird durch das chromosomale *mecA* Gen kodiert, welches sich innerhalb einer als SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome) bezeichneten Resistenzinsel befindet. Bei SCCmec handelt es sich um ein prinzipiell mobiles, aber relativ selten übertragenes genetisches Element. Hieraus folgt, dass sich MRSA in klonalen Linien ausbreiten, welche durch geeignete Typisierungsmethoden differenziert werden können [24, 80]. Insgesamt sind sechs Subtypen von SCCmec bekannt [44, 45, 46, 71]. Neben diesen intrinsisch resistenten Stämmen existieren auch sogenannte borderline-resistente *S. aureus* (BORSA), deren Resistenz auf einer Überexpression von Penicillinasen beruht [62]. Während BORSA klinisch keine Rolle spielen, geht die Infektion mit MRSA im Vergleich zu Infektionen mit Methicillin-empfindlichen Isolaten mit einer erhöhten Mortalität einher [17].

Seit dem Auftauchen der ersten klinischen Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolate haben sich MRSA schnell über weite Teile der Welt ausgebreitet. Ursächlich für die schnelle Ausbreitung waren wahrscheinlich in erster Linie eine ineffektive Infektionskontrolle und

der durch den zunehmenden Gebrauch antimikrobieller Chemotherapeutika aufgebaute Selektionsdruck [10]. So zeigen Daten des EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) für das Jahr 2005 eine MRSA-Prävalenz von 25 % in Europa. Dabei sind innerhalb Europas deutliche regionale Unterschiede erkennbar. Während der MRSA-Anteil im Mittelmeerraum zum Teil sehr hoch liegt (Portugal 47 %, Italien 37 %, Griechenland 42 %), finden sich in den nördlichen Staaten wie Dänemark, Finnland, Schweden, Norwegen, Island und Estland MRSA-Prävalenzen unter 3 % (Abbildung 1) [27, 35].

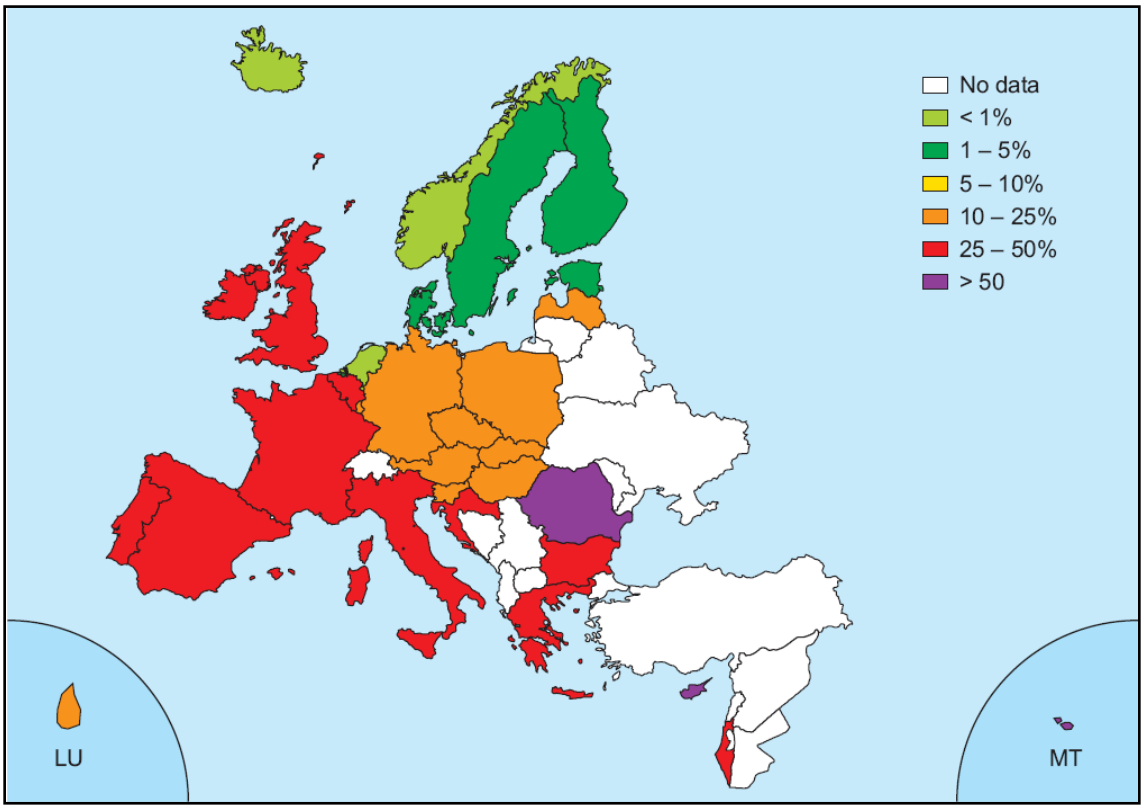

Abbildung 1: MRSA-Prävalenz in Europa (Anzahl MRSA / Gesamtzahl isolierter *S. aureus*) nach Grundmann et al. (EARSS Annual Report 2005) [35]

Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme sind häufig nicht nur gegen β-Laktamantibiotika sondern auch gegen eine Reihe weiterer Antibiotikaklassen resistent. So zeigen MRSA-Isolate in Europa Resistenzen gegen durchschnittlich 4,5 weitere Antibiotikaklassen. Vor allem gegen Chinolone, Makrolide, Aminoglykoside und Lincosamine finden sich in Europa Resistenzraten zwischen 71,7 und 89,5% [18].

Besonders besorgniserregend ist das Auftreten von MRSA-Stämmen mit Resistenzen gegen Glykopeptide wie Vancomycin und Teicoplanin. Bei der Glykopeptidresistenz von *S. aureus* wird zwischen einer intermediären Resistenz (MHK Vancomycin 8 bis 32 mg/L) und einer high-level-Resistenz (MHK Vancomycin >32 mg/L) unterschieden. Stämme mit einer intermediären Resistenz werden als Vancomycin/Glykopeptid-intermediate resistant *S. aureus* (VISA/GISA) bezeichnet, Stämme mit einer high-level-Resistenz als Vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) [67]. Der erste Fall von VISA wurde 1995 in Frankreich beschrieben [74]. In der Folge wurden in verschiedenen Ländern weitere VISA-Isolate identifiziert [7, 39, 40, 83]. In Vancomycin-empfindlichen Stämmen inhibieren die Glykopeptide die Zellwandsynthese indem sie an den D-ala-D-ala-Terminus von Zellwandvorläufern binden. Es wird angenommen, dass Mutationen zu einer Verdickung der Zellwand und einer vermehrten Anzahl nicht quer verbundener D-ala-D-ala-Termini in der Zellwand führen, welche die Glykopeptide innerhalb der verdickten Zellwand abfangen, ehe sie ihr Ziel erreichen können [86]. Das erste klinische VRSA-Isolat wurde im Juni 2002 in Michigan identifiziert. Der Resistenzmechanismus dieses Isolates entspricht dem aus den *Enterococcus spp.* bekannten VanA-Phänotyp [14]. Bis Anfang 2005 traten in den U.S.A. drei weitere klinische VRSA-Isolate auf, die ebenfalls den VanA-Phänotyp zeigten. Da das Vancomycin neben einigen neueren Alternativen wie Linezolid oder Daptomycin immer noch das Hauptstandbein der Therapie schwerer MRSA-Infektionen darstellt, ist diesen Erregern trotz ihres bisher seltenen Auftretens eine große Bedeutung beizumessen [92].

1.4 Molekularbiologische Typisierungsverfahren für MRSA

Die Zunahme Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme im Rahmen nosokomialer Infektionen stellt ein ernst zu nehmendes hygienisches und infektionsepidemiologisches Problem dar. Deshalb ist die Infektionsüberwachung, die in erster Line der Verhinderung nosokomialer Infektionen und der Kontrolle von Infektionsausbrüchen dient, besonders bei diesen Erregern von großer Bedeutung. Im Rahmen der Infektionsüberwachung von MRSA stellt die Bakterientypisierung insbesondere in Ausbruchssituationen ein wichtiges Instrument dar, um die Verwandtschaft

der aufgetretenen Isolate bestätigen oder ausschließen zu können und so rational über eventuell nötige infektionshygienische Maßnahmen entscheiden zu können [100].

Grundsätzlich lassen sich solche Verfahren zur Bakterientypisierung in genotypische und phänotypische Methoden unterteilen. Die Phänotypisierung differenziert verschiedene Stämme anhand phänotypischer Merkmale wie Antibiogramm, biochemischem Profil und Lysierbarkeit durch Bakteriophagen. Ein genereller Nachteil phänotypischer Methoden ist die Tendenz des untersuchten Merkmals sich aufgrund variabler Genexpression zu verändern. So können Änderungen der vorherrschenden Wachstumsbedingungen wie z.B. Temperatur oder pH-Wert zu Änderungen im Expressionsverhalten und somit auch im Phänotyp führen. Die Genotypisierung dagegen erlaubt die Analyse genomischer Merkmale eines Organismus, welche weniger starken Veränderungen durch äußere Einflüsse unterworfen sind und identifiziert unterschiedliche Stämme anhand von DNA-Polymorphismen.

Für die Beurteilung der Wertigkeit verschiedener Typisierungsmethoden sind Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Diskriminierungspotential die ausschlaggebenden Eigenschaften [72, 95]. Der Begriff Typisierbarkeit beschreibt den Anteil der untersuchten Stämme, denen mit einer Methode ein eindeutiges Ergebnis zugeordnet werden kann. Diesbezüglich zeigen phänotypisierende Methoden insgesamt häufiger nicht typisierbare Isolate, aber auch bei den genotypisierenden Methoden kommen nicht typisierbare Isolate vor. Der Begriff Reproduzierbarkeit beschreibt die Eigenschaft einer Methode bei wiederholtem Testen eines Stamms, identische Ergebnisse zu erbringen. Für epidemiologische Untersuchungen bedeutet dies, dass die Methode einem Stamm, der bei verschiedenen, in epidemiologischem Zusammenhang stehenden Patienten isoliert wurde, ein identisches Typisierungsergebnis zuweisen würde. Der Begriff Diskriminierungspotential beschreibt die Fähigkeit einer Methode, innerhalb einer Bakterienart distinkte Stämme differenzieren zu können. Die älteren phänotypisierenden Methoden wie das Antibiogramm oder die Serotypisierung zeigen ein geringeres Diskriminierungspotential als die neueren molekulargenetischen Techniken. Neben diesen drei Hauptkriterien sind aber noch weitere Aspekte wie Interpretierbarkeit, Praktikabilität, Kosteneffektivität und Automatisierung von großer praktischer Bedeutung [72, 90].

Die Bakterientypisierung spielt neben dem Einsatz im Bereich der lokalen Infektionsüberwachung auch eine Rolle bei globaleren epidemiologischen Fragestellungen. Hierbei soll die Verwandtschaft von Stämmen untersucht werden, die über einen langen Zeitraum oder an geographisch entfernten Orten isoliert wurden. Solche Stämme können im Laufe der Zeit erhebliche genetische Variationen im Vergleich zu ihrem gemeinsamen Vorfahren ansammeln. Deshalb werden für derartige Untersuchungen Methoden benötigt, die möglichst stabile genetische Marker untersuchen, dabei aber trotzdem ein hohes Diskriminierungspotential aufweisen. Ein typisches Beispiel für eine Methode, die langsam akkumulierende Variationen detektiert, ist das *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), welches sich für globale Langzeituntersuchungen bewährt hat. Im Bereich der lokalen Infektionsüberwachung dagegen können auch Methoden genutzt werden, die schneller Variationen ansammeln, da die hierbei betrachteten Stämme innerhalb überschaubarer Zeiträume isoliert werden. Diese Eigenschaft, Variationen schnell oder langsam anzusammeln, ist ein weiteres wichtiges Kriterium nach dem sich Typisierungsmethoden einordnen lassen [50].

Für die Typisierung von *Staphylococcus aureus* - und insbesondere von MRSA - ist eine Vielzahl verschiedener Methoden beschrieben [16, 33, 38, 42, 78, 98]. Gegenwärtig spielen drei genotypische Methoden eine herausragende Rolle: Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), die für die Typisierung von MRSA im Rahmen der Infektionsüberwachung weit verbreitet zum Einsatz kommt, das MLST, welches weniger im Routinelabor, dafür aber bei phylogenetischen Analysen genutzt wird und die *spa (S. aureus Protein A)*-Typisierung, für die der Einsatz in beiden Gebieten diskutiert wird. Diese drei Methoden werden im Folgenden genauer betrachtet.

Die Pulsfeldgelelektrophorese ist derzeit das am weitesten verbreitete Typisierungswerkzeug und stellt den „Goldstandard“ für die Infektionsüberwachung im mikrobiologischen Routinelabor dar [70, 76]. Bei dieser Methode wird das bakterielle Genom, welches bei *Staphylococcus aureus* etwa 2800 kB groß ist, mittels eines Restriktionsenzyms geschnitten. Hierbei werden Restriktionsenzyme verwendet, die wenige Erkennungssequenzen auf dem bakteriellen Genom haben und daher nur ca. 15 – 30 Restriktionsfragmente mit einer Größe von 10 – 800 kB erzeugen. Um diese Fragmente vor unspezifischen Brüchen durch Scherkräfte zu schützen, werden die Bakterien vor der DNA-

Extraktion und dem Restriktionsverdau in eine Agarosematrix eingebettet. Da die konventionelle Gelelektrophorese nur Fragmente von bis zu 30 kB effizient auftrennen kann, ist sie für die Auftrennung dieser Fragmente nicht geeignet. Erst das multidirektionale Spannungsfeld der Pulsfeldgelelektrophorese ermöglicht die effiziente Auftrennung von Fragmenten dieser Größe. Die alternierenden Richtungswechsel des multidirektionalen Spannungsfeldes werden durch drei Elektrodensets erzeugt, die hexagonal um das Agarosegel in der Elektrophoresekammer angeordnet sind. Diese Richtungswechsel zwingen die DNA-Fragmente, sich immer wieder neu im elektrischen Feld auszurichten und ermöglichen ihnen, schneller durch die Agarosematrix zu wandern. Nach der Auftrennung können die Banden unter UV-Beleuchtung fotografisch dokumentiert werden [75, 76, 90, 100].

Die auf diese Weise erzeugten Bandenmuster stammen üblicherweise von Isolaten, deren mutmaßliche epidemiologische Verwandtschaft, z.B. in einer Ausbruchssituation, überprüft werden soll. Im Idealfall haben verwandte Isolate ein identisches PFGE-Muster. Häufiger kommt es aber vor, dass die bakterielle DNA durch zufällige genetische Ereignisse verändert wird. Für die Interpretation der hieraus resultierenden Bandenmuster ist es wichtig, sich die Auswirkungen verschiedener genetischer Ereignisse wie Punktmutationen, Insertionen und Deletionen auf das Bandenmuster bewusst zu machen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Effekte genetischer Ereignisse auf PFGE-Muster (nach Tenover)

Genetisches Ereignis	Resultierende Veränderungen im PFGE-Muster im Vergleich zum Ausgangsmuster	Resultierende Anzahl Bandenunterschiede
Punktmutation, die neue Restriktionsschnittstelle schafft	Im veränderten PFGE-Muster fehlt ein größeres Fragment; zwei neue, kleinere Fragmente, die im Ursprungsmuster nicht vorhanden sind, kommen hinzu. Die Summe der Größen der neuen Banden entspricht der Größe der fehlenden Bande.	3
Punktmutation, die zu Verlust einer Restriktionsschnittstelle führt	Im veränderten PFGE-Muster ist ein neues größeres Fragment vorhanden; zwei kleinere Fragmente, die im Ursprungsmuster vorhanden sind, fehlen.	3

Insertion von DNA in ein vorhandenes Restriktionsfragment (hinzugekommene DNA enthält keine Restriktionsschnittstelle)	Das veränderte PFGE-Muster zeigt die gleiche Anzahl an Fragmenten, es fehlt aber ein kleineres Fragment, dafür kommt ein größeres hinzu.	2
Deletion von DNA aus einem vorhanden Restriktionsfragment (entfernte DNA enthält keinen Restriktionsschnittstelle)	Das veränderte PFGE-Muster zeigt ein neues kleineres Fragment, dafür fehlt ein größeres Fragment.	2

So können Punktmutationen dazu führen, dass Restriktionsschnittstellen hinzukommen oder verloren gehen. Entsteht eine neue Restriktionsschnittstelle, hat dies zur Folge, dass das Fragment, auf dem sich die neue Restriktionsschnittstelle befindet, aus dem PFGE-Muster verschwindet, dafür aber zwei neue, kleinere Fragmente zu finden sind. Die Summe der Fragmentgrößen entspricht der des ursprünglichen Fragments. Geht eine Restriktionsschnittstelle aufgrund einer Punktmutation verloren, so fehlen im veränderten PFGE-Muster zwei kleinere Fragmente und ein neues größeres Fragment erscheint. Folglich weisen PFGE-Muster, die sich durch eine solche Punktmutation unterscheiden, typischerweise drei Unterschiede auf. Anders als bei den Punktmutationen bleibt bei Deletionen und Insertionen die Anzahl der Fragmente in den PFGE-Mustern gleich. Bei Deletionen, also dem Verlust eines DNA-Abschnittes, verschwindet ein größeres Fragment und ein kleineres erscheint stattdessen. Bei Insertionen, also dem Zugewinn eines DNA-Abschnittes, verhält es sich umgekehrt. Folglich zeigen PFGE-Muster nach Deletionen bzw. Insertionen zwei Unterschiede (Tabelle 1). Unter Kenntnis dieser typischen Konstellationen, lässt sich die Anzahl der stattgefundenen Ereignisse aus den PFGE-Mustern der untersuchten Stämme ableiten. Diese Anzahl an Ereignissen ist das entscheidende Kriterium für die Beurteilung des Grades an Verwandtschaft der untersuchten Isolate und damit auch der Zugehörigkeit eines Isolates zu einem Ausbruch. Nach Tenover werden vier Grade der Verwandtschaft, die sich aus PFGE-Mustern ableiten lassen, unterschieden [90, 91] (Tabelle 2). Isolate mit im Vergleich zum Ausbruchsstamm identischem Bandenmuster fallen in die Kategorie „Ununterscheidbar“. In einer Ausbruchssituation wird ein Isolat dieser Kategorie als sicher dem Ausbruch zugehörig

gewertet, sofern es sich nicht um einen in der Region dominanten Epidemiestamm handelt. Isolate, deren PFGE-Muster sich in zwei bis drei Banden vom Ausbruchsstamm unterscheiden (entsprechend einem genetischen Ereignis), werden der Kategorie „Eng verwandt“ zugerechnet. In einer Ausbruchssituation wird die Zugehörigkeit dieses Isolats zum Ausbruch als wahrscheinlich angesehen, da derartige Variationen schon bei mehrfacher Kultivierung desselben Isolates oder bei wiederholtem Nachweis eines Isolates beim gleichen Patienten auftreten. Isolate, deren PFGE-Muster sich in vier bis sechs Banden (entsprechend zwei unabhängigen genetischen Ereignissen) vom Ausbruchsstamm unterscheiden, werden der Kategorie „Möglicherweise verwandt“ zugeordnet. Wird ein Isolat dieser Kategorie in einer Ausbruchssituation gefunden, ist die Zugehörigkeit des Isolats zum Ausbruch zwar eher unwahrscheinlich, vor allem bei großen Ausbrüchen, die sich über lange Zeiträume erstrecken, aber möglich. Isolate deren PFGE-Muster sich in sieben oder mehr Banden vom Ausbruchsstamm unterscheiden, werden der Kategorie „Nicht Verwandt“ zugeordnet. In diesem Fall stimmen häufig über 50 % der Banden mit dem Ausbruchsstamm nicht überein [91].

Tabelle 2: Kriterien für die Interpretation von PFGE-Mustern (nach Tenover)

Kategorie	Anzahl genetischer Ereignisse im Vergleich zum Ausgangsisolat	Typische Anzahl Fragmentunterschiede	Epidemiologische Interpretation
Ununterscheidbar	0	0	Isolat ist Teil des Ausbruchs
Eng verwandt	1	2-3	Isolat ist wahrscheinlich Teil des Ausbruchs
Möglicherweise verwandt	2	4-6	Isolat ist möglicherweise Teil des Ausbruchs
Nicht verwandt	≥3	≥7	Isolat gehört nicht zu Ausbruch

Die Vorteile der Pulsfeldgelelektrophorese liegen in einem sehr hohen Diskriminierungspotential, einem sehr hohen Anteil typisierbarer Stämme, einer innerhalb eines Labors guten Reproduzierbarkeit, sowie in einer relativ einfachen Interpretation, für

die es klare Richtlinien gibt [43, 90]. Die Nachteile dieser Methode sind in den hohen Kosten für die Anschaffung der Geräte sowie in der kostenintensiven, arbeitsaufwendigen und relativ zeitaufwendigen Durchführung zu sehen [100]. Problematisch ist außerdem die mangelnde Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Labore, da die Methode nach vielen unterschiedlichen Protokollen durchgeführt wird und auch die Interpretation der Bandenmuster, sofern keine computergestützten Auswertungsverfahren genutzt werden, subjektiven Einflüssen unterworfen ist [96]. Durch die Verwendung standardisierter Protokolle, computergestützter Auswertungsverfahren und umfangreicher Datenbanken ist eine Verbesserung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Labore jedoch möglich [61, 69, 70].

Im Gegensatz zur Pulsfeldgelelektrophorese handelt es sich bei der von Frenay *et al.* im Jahr 1996 entwickelten *spa (S. aureus* Protein A)-Typisierung um eine Sequenz-basierte Methode, bei der ein einzelner hochvariabler Bereich innerhalb der X-Region des *spa*-Gens, untersucht wird [28]. Das *spa*-Gen ist aus ca. 2150 Basenpaaren aufgebaut und gliedert sich in zwei Abschnitte, die Fc-Bindungsregion und die X-Region. Letztere wiederum wird in einen C-Terminus, dessen Sequenz der Zellwandverankerung dient und einen hochvariablen, repetitiven Bereich unterteilt, dessen Funktion noch nicht abschließend geklärt ist. Dieser polymorphe Bereich innerhalb der X-Region ist aus einer variablen Anzahl kurzer (21-27 Basenpaare), direkt aufeinanderfolgender Sequenzabschnitte (Repeats) aufgebaut [36, 93, 97] (Abbildung 2).

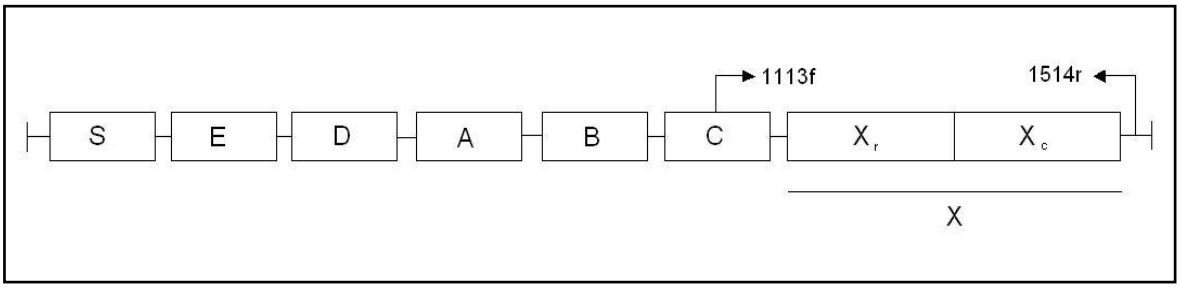

Abbildung 2: Genetische Organisation des *S. aureus* Protein A-Gens (*spa*) modifiziert nach Shopsin et al. [82]. Die Pfeile symbolisieren die für die Sequenzierung verwendeten Primer, die Kästchen symbolisieren Genabschnitte die für verschiedene Regionen des Protein A kodieren: Signalssequenz (S), die IgG-Bindungsregion (A-D), eine zu A-D homologe Region (E) und die X-Region mit ihrem repetitiven Abschnitt (X_r) und der Zellwandverankerung (X_c).

Ursächlich für den ausgeprägten Polymorphismus dieser Region sind sowohl Duplikationen, Deletionen und Insertionen ganzer Repeats als auch Punktmutationen innerhalb einzelner Repeats. Beidseits der variablen Region vorhandene, hochkonservierte Sequenzabschnitte ermöglichen den Einsatz von Primern zur Amplifikation der Sequenz mittels PCR und die anschließende Sequenzierung [82]. Der *spa*-Typ wird schließlich aus der Reihenfolge der spezifischen Repeats abgeleitet. Für die Analyse dieses Repeatmusters wurde in dieser Arbeit die inzwischen weit verbreitete StaphType Software der Firma Ridom verwendet. Diese Software erkennt aus den eingegebenen Sequenzdaten automatisch die Repeatfolge und leitet den entsprechenden *spa*-Typ ab. Zur Gewährleistung einer einheitlichen Nomenklatur synchronisiert das Programm die gefundenen *spa*-Typen und -Repeats über das Internet mit einem zugehörigen zentralen Server. Werden neue *spa*-Repeats oder -Typen entdeckt, können diese im Rahmen einer Synchronisation an den Server übermittelt werden, um eine eindeutige Bezeichnung für diese zu erhalten. Derzeit sind 4699 *spa*-Typen in der Datenbank des Zentralen Servers registriert (http://spaserver.ridom.de/, Stand Januar `09). Daneben verfügt die Software über eine Datenbankfunktion, die eine Verknüpfung der Typisierungsdaten mit epidemiologischen Daten ermöglicht [37]. Seit kurzem beinhaltet die Software einen als BURP (Based Upon Repeat Pattern) bezeichneten Cluster-Algorithmus, der es erlaubt, Verwandtschaften zwischen Isolaten anhand von Übereinstimmungen in ihren Repeatmustern abzuleiten und Gruppen verwandter *spa*-Typen (*spa*-Cluster) zu bilden [65, 81, 87]. Hierbei werden Duplikation, Verlust und Austausch ganzer Repeats sowie Punktmutationen zur Berechnung der Verwandtschaft verschiedener *spa*-Typen berücksichtigt. Der Algorithmus bietet zwei durch den Benutzer festzulegende Parameter, welche die Clusterbildung beeinflussen. So kann die minimale Anzahl Repeats, welche ein *spa*-Typ aufweisen muss, um in die Clusteranalyse einbezogen zu werden, definiert werden. Dies ist sinnvoll, da sehr kurze Repeatfolgen nicht genügend Informationen enthalten, um eine verlässliche Ableitung von Verwandtschaft zu gewährleisten. Der zweite Parameter „costs“ bezieht sich auf die maximale Anzahl genetischer Ereignisse zwischen zwei *spa*-Typen, bei welcher noch eine Verwandtschaft abgeleitet wird. Mellmann et al. konnten anhand von Clusteranalysen von 400 *S. aureus*-Stämmen mittels *spa*-Typsierung/BURP und MLST die optimalen Werte für diese Parameter ermitteln (minimale

Anzahl Repeats: 5; „Costs“: 4) und mit diesen Einstellungen eine 95,3 prozentige Konkordanz zu den MLST-Clustern zeigen [66]. Analog hierzu konnten Strommenger et al. eine hohe Konkordanz zwischen BURP-Clustern und Clustern, die mittels Multilocus Sequence Typing bzw. Pulsfeldgelelektrophorese gebildet wurden, zeigen [88].

Ein großer Vorteil der *spa*-Typisierung im Vergleich zur Pulsfeldgelelektrophorese liegt in der deutlich besseren Reproduzierbarkeit dieser Methode in verschiedenen Laboren, ohne dass hierfür eine aufwendige Standardisierung der Durchführung notwendig ist [3]. Weiter zeichnet sich die *spa*-Typisierung durch einen sehr hohen Anteil typisierbarer Isolate [50, 63, 64], eine schnelle, einfache Durchführung [63] sowie durch eine unkomplizierte Interpretierbarkeit aus [82]. Im Hinblick auf das Diskriminierungspotential gibt es sowohl Studien, die der *spa*-Typisierung im Vergleich zur Pulsfeldgelelektrophorese ein höheres Auflösungsvermögen zuschreiben [50, 88], als auch solche, die ein höheres Diskriminierungspotential für die Pulsfeldgelelektrophorese zeigen [82, 89]. Obwohl diese Studien die Interpretation nahe legen, dass sich beide Methoden auf einem vergleichbar hohen Niveau bewegen, ist die Frage nach dem überlegenen Diskriminierungspotential noch nicht endgültig zu beantworten. Auch die Frage nach der Stabilität des *spa*-Gens als genetischer Marker ist noch nicht abschließend geklärt. Während in zwei Studien sowohl in vitro als auch in vivo eine hohe Stabilität für das *spa*-Gen nachgewiesen wurde [28, 82], zeigten Kahl et al. anhand der Untersuchung von Folgeisolaten aus den Atemwegen von Patienten mit Cystischer Fibrose eine höhere Mutationsrate. Durchschnittlich alle 70 Monate trat innerhalb des *spa*-Gens eine genetisches Ereignis auf [47].

Das Multilocus Sequence Typing (MLST) wurde erstmals im Jahr 1998 von Maiden et al. als eine sequenz-basierte Methode für die Identifizierung hypervirulenter *Neisseria menigitidis*-Stämme beschrieben [57]. In der Folge erwies sich das MLST als geeignete Methode für die Typisierung vieler Bakterien- und Pilzarten. Insgesamt bestehen MLST-Schemata für über 20 Bakterienarten [94] und drei Pilzarten [9, 20]. Im Jahr 1999 entwickelten Enright et al. ein MLST-Schema für die Typisierung von *Staphylococcus aureus*. Dieses MLST-Schema charakterisiert *S. aureus*-Isolate mittels der Sequenzierung von sieben etwa 450 Basenpaaren umfassenden Genfragmenten, die sich innerhalb essentieller Gene („*housekeeping genes*“) befinden (Tabelle 3). Die Sequenzen jedes Genfragments werden mit allen zuvor an diesem Genlocus identifizierten Sequenzen

(Allelen) (www.mlst.net) verglichen und einer Allelnummer für diesen Locus zugeordnet. Die Kombination der Allelnummern der sieben Genfragmente ergibt schließlich ein Allelprofil, welches eindeutig den Sequenztyp (ST) eines Isolats definiert [1, 23]. Die beim MLST untersuchten Fragmente innerhalb der essentiellen Gene zeichnen sich durch eine langsame Akkumulation von Variationen aus. Diese Stabilität macht es erforderlich, mehrere Genfragmente gleichzeitig zu betrachten, um ein ausreichend hohes Diskriminierungspotential zu erzielen. Die hieraus resultierende Kombination aus hohem Diskriminierungspotential und gleichzeitig großer Stabilität des MLST erlaubt es, auch geographisch und zeitlich getrennte Stämme auf Klonalität zu untersuchen. Ein grundlegender Vorteil aller Methoden, die mehrere über das Genom verteilte Genorte untersuchen, gegenüber solchen, die nur ein einzelnes Genfragment untersuchen, ist ihre geringere Anfälligkeit gegenüber Rekombinationsereignissen. So ist bei ersteren im Falle eines Rekombinationsereignisses in der Regel nur ein Genfragment betroffen und das untersuchte Isolat kann immer noch anhand der übrigen Fragmente korrekt eingeordnet werden. Bei Methoden, die nur ein Genfragment untersuchen, besteht dagegen die Möglichkeit, dass im wesentlichen identische Isolate als komplett unterschiedlich erkannt werden, wenn der untersuchte DNA-Abschnitt von einem Rekombinationsereignis betroffen ist [85].

Tabelle 3: "Housekeeping Genes" des MLST-Schemas für die Typisierung von *S. aureus*

Gen	**Anzahl Allele**
Carbamate kinase (arcC)	107
Shikimate dehydrogenase (aroE)	150
Glycerol kinase (glpF)	117
Guanylate kinase (gmk)	84
Phosphate acetyltransferase (pta)	111
Triosephosphate isomerase (tpi)	117
Acetyl-coA acetytransferase (yqiL)	107

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Für epidemiologische Untersuchungen der Übertragungswege Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Isolate stehen derzeit verschiedene molekularbiologische Verfahren wie die Pulsfeldgelelektrophorese, die *spa*-Typisierung und das MLST zur Verfügung. Jedoch ist die Wertigkeit der einzelnen Methoden sowohl für die Routinediagnostik zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge als auch für phylogenetische Analysen noch nicht ausreichend geklärt. Die Zielsetzung der Arbeit bestand darin, anhand retrospektiver, longitudinaler Untersuchungen von MRSA-Klonen aus der institutseigenen Stammsammlung über einen Zeitraum von vier Jahren, die Aussagekraft der Pulsfeldgelelektrophorese, die den derzeitigen „Goldstandard“ darstellt, mit der *spa*-Typisierung zu vergleichen. Eine der Pulsfeldgelelektrophorese vergleichbare Wertigkeit der *spa*-Typisierung würde eine erhebliche Beschleunigung der Beurteilung epidemiologischer Zusammenhänge in der Routinediagnostik ermöglichen, da sie als sequenzbasierte Methode ohne Mehrkosten in einem wesentlich kürzeren Zeitraum Ergebnisse liefert.

Zur Beurteilung der Wertigkeit der *spa*-Typisierung sollte erstens untersucht werden, wie stabil das *spa*-Gen als genetischer Marker über lange Zeiträume ist. Hierzu wurden Folgeisolate von drei Patienten, bei denen über Zeiträume von mehreren Jahren immer wieder MRSA nachgewiesen wurde, mittels *spa*-Typisierung und PFGE untersucht. Zweitens sollte die Möglichkeit einer Subtypisierung von im Pulsfeldmuster identischen Klonen mittels der *spa*-Typisierung untersucht werden. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die zwei im Raum Hamburg prädominanten MRSA-Klone „Berlin“ und „Barnim“, die über einen Zeitraum von vier Jahren regelmäßig isoliert wurden, mit der *spa*-Typisierung untersucht. Darüber hinaus wurden zwei weitere in Hamburg endemische, aber nicht so häufig vorkommende, Klone untersucht. Drittens sollte geklärt werden, ob in der Pulsfeldgelelektrophorese als nicht-klonal identifizierte Isolate in der *spa*-Typisierung als verwandt oder identisch erkannt und somit klonal fehlklassifiziert werden. Zur Beantwortung dieser Frage wurden 21 in Hamburg mittels Pulsfeldgelelektrophorese als sporadisch identifizierte Isolate ausgewählt und mit der *spa*-Typisierung untersucht. Viertens sollte herausgefunden werden, ob sich mittels des BURP (Based Upon Repeat Pattern)-Algorithmus der Staphtype-Software die klonalen Zusammenhänge von MRSA-

Isolaten korrekt darstellen lassen. Für diese Analyse wurden die für die sporadischen Isolate unter Verwendung von BURP ermittelten Cluster, mit denen der PFGE und des MLST verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Geräte

Laborgerät	Hersteller
Zentrifuge 5415D Eppendorfreaktionsgefäße Pipetten (100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Gelkammer Plastikkämme Pulsfeldgelelektrophoresekammer (GenePath System) Agaroseblockgießvorrichtung (Plug Mold) Kühlpumpe	Bio-Rad, München
Schüttelwasserbad GFL Wasserbad GFL	AD Krauth, Hamburg
Heizblock	Techne, Cambridge
Vortexer	Heidolph, Schwabach
UV-Lampe Geldokumentationsgerät	Fröbe Labor Technik, Berlin
Brutschrank	Heraeus-Christ, Osterode
Analysenwaage PC440	Mettler Waagen GmbH, Gießen
Thermocycler Primus 96	MWG Biotech AG, Martinsried

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
NaCl Borsäure NaOH HCl	Merck, Darmstadt
Trihydroxyaminomethane (Tris) Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Na-EDTA Agarose, Type II	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Low melting point (LMP)-Agarose	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Na-Desoxycholat	Serva, Heidelberg
Na-Lauryl-Sarkosin	Sigma, München

2.1.3 Medien

Angegeben ist die Zusammensetzung für die Flüssigmedien, wobei die jeweiligen Bestandteile in VE-Wasser gelöst und anschließend autoklaviert wurden.

TSB (Tryptic Soy Broth):

Oxoid (TSBOXOID), Basingstoke (England): 30 g TSB ad 1000 ml H_2O

2.1.4 Reagenzien und Enzyme

Tabelle 6: Übersicht über verwendete Reagenzien und Enzyme

Reagenz/Enzym/Kit	**Hersteller**
SuRE / Cut Buffer A Restriktionsenzym *SmaI*	Roche Diagnostics GmbH, Steinheim
Proteinase K Lysozym	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Lysostaphin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DyNAzyme DNA-Polymerase dNTP Mix 10x DyNAzyme Buffer	Finnzymes, Espoo
TripleMaster Polymerase Mix 10x HighFidelity Buffer with Mg dNTP Mix	Eppendorf, Hamburg
InstaGene Matrix	Bio-Rad Laboratories, Hercules
GeneClean II Kit	Qbiogene, Heidelberg
QIAamp DNA Mini Kit QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5 Primer

Tabelle 7: Übersicht über verwendete Primer

Primer	**Sequenz**
MLST	
arc f	5' TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC -3'
arc r	5' AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG -3'
aro f	5' ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC -3'
aro r	5' GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC -3'
glp f	5' CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C -3'
glp r	5' TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC -3'
gmk f	5' ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC -3'
gmk r	5' TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA -3'
pta f	5' GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG -3'
pta r	5' GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA -3'
tpi f	5' TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA -3'
tpi r	5' TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC -3'
yqi f	5' CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC -3'
yqi r	5' CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC -3'
spa	
spa-1113f	5' TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C -3'
spa-1514r	5' CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT-3'

2.1.5 Isolate

Die 182 verwendeten klinischen Isolate wurden im Zeitraum von 2000 bis 2005 bei Patienten verschiedener Hamburger Kliniken isoliert und bis zur weiteren Untersuchung bei – 80°C in der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene am UKE gelagert. Eine Übersichtstabelle über die verwendeten Isolate befindet sich im Anhang.

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht der Kulturen

Die Anzucht der MRSA-Kulturen für die Pulsfeldgelelektrophorese erfolgte in 10 ml TSB bei 37°C über Nacht. Zur Herstellung von Reinkulturen wurde zunächst jeweils ein Plasikkügelchen des Stammhaltungssystems, an denen die Bakterien im gefrorenen Zustand haften, unter Verwendung einer sterilen Plastiköse aus dem Aufbewahrungsröhrchen auf eine sterile Blutagarplatte gegeben. Anschließend wurde die Kugel auf einem Drittel der Platte ausgestrichen und ein 3-Ösen-Ausstrich durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde nun jeweils eine einzeln stehende Bakterienkolonie mit Hilfe einer Plastiköse in 10 ml TSB überführt. Dieser Ansatz wurde dann über Nacht bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Für die *spa*-Typisierung erfolgte die Anzucht der Kulturen direkt auf Blutagarplatten. Die Inkubation erfolgte für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C.

Für das *Multi Locus Sequence Typing* wurde nach 24-stündiger Inkubation auf einer Blutagarplatte bei 37°C eine einzeln stehende Kolonie in 10 ml mit 1% Glycin angereicherte TSB überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese

Für die Pulsfeldgelelektrophorese verwendete Lösungen:

<u>500ml 5M NaCl</u>
146,1 g NaCl
aqua bid. ad 500 ml

<u>100 ml 2 M Tris-HCl-Lösung (pH 7,5)</u>
24,24 g Tris
aqua bid. ad 100 ml
pH-Einstellung mit HCl auf pH 7,5

<u>500 ml 0,5 M Na-EDTA-Lösung (pH 7,5)</u>
93,06 g Na-EDTA
aqua bid. ad 500 ml

<u>1000 ml SE-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA/pH 7,5)</u>
15 ml 5 M NaCl
50 ml 0,5 M Na-EDTA (pH 7,5)
aqua bid. ad 1000 ml

5 ml 1,6% LMP-Agarose
80 mg Low melting point (LMP)-Agarose
5 ml SE-Puffer
Aufkochen und verwenden oder bei -20°C einfrieren.

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

Lysis-Lösung I
6 mM Tris-HCl pH 7,6
1 M NaCl
100 mM EDTA pH7,5
0,2% Na-Desoxycholat
1% Na-Lauryl-Sarkosin
1 mg Lysozym direkt vor Gebrauch

1000 ml ES-Lösung (pH 9,0) zur Herstellung der Lysis-Lösung II
10 g Laurylsarkosin
1000 ml 0,5 M EDTA
Einstellung pH 9,0 mit NaOH

1000 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM Na-EDTA)
5 ml 2 M Tris-HCl (pH 7,5)
20 ml 0,5 M Na-EDTA (pH 7,5)
aqua bid. ad 1000 ml

1000 ml 10 x konzentrierter TBE-Puffer (0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA pH 8)
109 g Tris
55,6 g Borsäure
7,4 g Na-EDTA
aqua bid. ad 1000 ml

Für die Pulsfeldgelelektrophorese mussten die Bakterien, um eine unspezifische Restriktion ihrer DNA zu verhindern, zunächst in einen Agaroseblock eingebracht werden. Hierzu wurden 800 µl der Bakteriensuspension in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 1 ml SE-Puffer resuspendiert und anschließend erneut 2 min bei

12000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und anschließend das Bakterienpellet in 500 ml SE- Puffer resuspendiert. Zur Einbettung der intakten Bakterien in die Agaroseblöcke wurde zunächst 1,6% LMP- Agarose bei 90°C im Wasserbad verflüssigt und anschließend bei 50°C im Heizblock aufbewahrt. Jeweils 1 ml der 1,6% LMP- Agarose wurde, sobald sie ihre Endtemperatur erreicht hatte, mit einer Spatelspitze Lysozym und 10 µl Lysostaphin versetzt. Nun konnten je 125 µl Bakteriensuspension und 125 µl 1,6% LMP- Agarose in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und gevortext werden. Schließlich wurde dieser Ansatz in den Gießblock überführt und für 20 min bei 4°C gekühlt bis die Agarose ausgehärtet war.

Die anschließende Zelllyse erfolgte durch Inkubation der erstarrten Agaroseblöcke in jeweils 1 ml Lysis- Lösung I (1 ml Basislösung, 5 mg Lysozym/ml und 40 Units Lysostaphin/ml) bei 36°C und leichter Schüttelbewegung über Nacht. Es folgte die Spaltung der Proteine durch Inkubation der Agaroseblöcke in 1 ml Lysis- Lösung II (1 ml ES-Lösung und 2 µl Proteinase K-Lösung (1,09 U/µl)) bei 56°C über Nacht im Brutschrank.

Anschließend wurden die Blöckchen 4-mal für je eine Stunde in 10 ml TE – Puffer bei leichter Schüttelbewegung gewaschen. Nach Entfernung des TE – Puffers wurden die Blöckchen für eine Stunde in 800 µl Restriktionspuffer A äquilibriert. Der Restriktionsverdau erfolgte durch Inkubation der Blöckchen in 100 µl Restriktionspuffer A und 4 µl *Sma I* über Nacht bei 25°C im Heizblock.

Zur Herstellung des Laufgels wurden 140 ml TBE - Puffer und 1,4 g Sigma - Agarose über dem Bunsenbrenner aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 60°C in die Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. 2 ml der flüssigen Agarose wurden zum späteren Verschließen der Geltaschen bei 60°C im Heizblock aufbewahrt.

Nach Entfernen des Kamms aus dem bei Raumtemperatur nach ca. 30 min erstarrten Gel, konnten die Agaroseblöckchen unter Verwendung eines Metallspatels in die Geltaschen überführt werden. In die 1. Position des Gels wurde als Marker ein Blöckchen mit DNA des Stammes NCTC 8325 gegeben. Die mit Agaroseblöckchen beladenen Geltaschen wurden mit der aufbewahrten flüssigen Agarose luftblasenfrei verschlossen. Das Laufgel konnte nun in das Pulsfeldgelelektrophoresegerät gegeben werden, der vorgekühlte Laufpuffer

hinzugegeben werden und die Elektrophorese mit folgenden Einstellungen durchgeführt werden.

PFGE – Einstellungen:

Block 1 :	5 – 50 s für 24 h
Block 2 :	Ø
Spannung:	6,0 V / cm
Winkel:	120°
Elektrophorese- Puffer:	TBE-Puffer (0,5fach)
Umwälzrate der Pumpe:	100%
Kühltemperatur:	14°C

Die Gelfärbung erfolgte mit Ethidium-Bromid (20 µl Ethidium-Bromid in 400 ml TBE-Puffer) für 25 min unter leichter Rotationsbewegung auf einem Schüttler. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Banden mittels einer UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

2.2.3 Extraktion der bakteriellen DNA

Die Extraktion der bakteriellen DNA für die *spa*-Typisierung erfolgte unter Verwendung der InstaGene-Matrix der Firma Bio-Rad Laboratories.

Zunächst wurden abhängig von ihrer Größe ca. 2-5 Kolonien mit Hilfe einer sterilen Plastiköse von der Blutagarplatte abgetragen und in 500 µl HPLC-Wasser in einem Eppendorfreaktionsgefäß suspendiert. Nach Zentrifugation bei 12000 rpm für 1 Minute wurde der Überstand dekantiert und dem Pellet 100 µl InstaGene-Matrix beigegeben. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 20 Minuten bei 56°C im Wasserbad inkubiert und anschließend erneut 10 Sekunden gevortext. Es folgten eine weitere Inkubation bei 100°C für 8 Minuten und abermaliges Vortexen für 10 Sekunden. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 12000 rpm konnten 80 µl des Überstands (DNA) vorsichtig abpipettiert

werden und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt werden. 10 µl wurden für einen 50 µl PCR-Ansatz entnommen, die übrige DNA bei – 20°C eingefroren.

Für das Multi Locus Sequence Typing erfolgte die Extraktion der bakteriellen DNA unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kit nach einer Standartarbeitsanweisung. Dieses Kit enthält als Reaktionsgefäße Säulen, in denen eine Silica-Gel Membran angebracht ist.
Als erster Schritt wurden 500 µl der Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Tube gegeben und für 10 Minuten bei 7500 rpm zentrifugiert. Zur Lyse der Bakterien und Hydrolyse von Proteinen wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert und 5 µl Lysostaphin sowie 20 µl Proteinase K hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen folgte eine 30-minütige Inkubation bei 56°C im Wasserbad. Anschließend wurden zur Erzeugung optimaler Adsorptionsbedingungen 200 µl AL-Puffer hinzugegeben, gevortext und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Der Ansatz wurde nun nach Zugabe von 200 µl Ethanol und abermaligem Vortexen in die in die QIAamp-Säulen gegeben, welche ihrerseits in den 2 ml Auffanggefäßen platziert wurden. Zur Bindung der DNA an die in den Säulen enthaltene Silica-Gel Membran erfolgte anschließend die Zentrifugation der Säule für eine Minute bei 8000 rpm. In einem neuen Auffanggefäß erfolgten nun zur Entfernung von Kontaminationen zwei Waschschritte. Hierfür wurden 500 µl AW1-Puffer in die Säule gegeben und wieder für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nun noch einmal mit dem AW-Puffer wiederholt, die Zentrifugation erfolgte bei 14000 rpm für 3 Minuten. Zur abschließenden Elution der DNA wurde die QIAamp-Säule in ein sauberes 1,5 ml Eppendorftube gegeben und es wurden 200 µl AE-Puffer hinzugegeben. Nach 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde abschließend für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Erfolg der Extraktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Zur Vorbereitung auf die folgende PCR wurden die DNA-Konzentrationen anhand der Intensität der Banden abgeschätzt und entsprechend Verdünnungen von 1:5, 1:10 und 1:50 hergestellt.

2.2.4 Amplifikation der DNA

Für die *spa*-Typisierung erfolgte die Amplifikation der DNA nach dem Prinzip der Polymerase Kettenreaktion in einem 50 µl-Ansatz, der neben 10 µl der extrahierten DNA 1

µl dNTPs (10 mM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 µl von jedem Primer (10 µM), 5 µl des 10fach PCR – Puffers, 30,5 µl HPLC-Wasser und 0,5 µl (1 U) DyNAzyme DNA–Polymerase enthielt. Die im Cycler aufeinander folgenden Reaktionsbedingungen setzten sich zusammen aus einer initialen Denaturierung bei 80°C für 5 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen, bestehend aus einer weiteren Denaturierung bei 94°C für 45 Sekunden, der Anlagerung der Primer bei 60°C für 45 Sekunden und der Elongation bei 72°C für 90 Sekunden. Abschließend folgte eine Elongation bei 72°C für 10 Minuten. Der Erfolg der Amplifikation wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

Die Amplifikation der DNA für das MLST erfolgte ebenfalls in einem 50 µl-Ansatz, der sich wie folgt zusammensetzt:

- 2 µl der bereits verdünnten extrahierten DNA (siehe Oben)
- 39,5 µl HPLC-Wasser
- 5 µl 10fach PCR-Puffer
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl Primer f (10 µM)
- 1 µl Primer r (10 µM)
- 0,5 µl TripleMaster Polymerase Mix (2,5 U)

Die im Cycler aufeinander folgenden Reaktionsbedingungen setzten sich zusammen aus einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen, bestehend aus einer weiteren Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, der Anlagerung der Primer bei 58°C für 1 Minute und der Elongation bei 72°C für 1 Minute. Abschließend folgte eine weitere Elongation bei 72°C für 7 Minuten. Der Erfolg der Amplifikation wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Anwendung kamen Agarosegele mit einer Konzentration von 1%. Hierzu wurden 5 g Agarose in 250 ml TBE – Puffer durch Kochen auf dem Bunsenbrenner gelöst und nach Abkühlung auf unter 60°C und Vermeidung von Luftblasen in eine Horizontalgelkammer

gegossen. Wahlweise 15 oder 20 Geltaschen wurden durch Einhängen entsprechender Kämme in das noch flüssige Gel vorgegeben. Das nach ca. 30 Minuten ausgehärtete Gel konnte nun in die Elektrophoresekammer überführt werden und die Kammer mit 1 x konz. TBE-Puffer soweit aufgefüllt werden, dass das Gel gerade von Flüssigkeit bedeckt war. 15 µl des Amplifikats wurden mit 5 µl Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Die Auftrennung erfolgte in einem Gleichstromfeld bei einer Spannung von 95 V über 1,2 h. Die Laufstrecke konnte anhand der blauen Bande des Probenpuffers beurteilt werden. Die Gelfärbung erfolgte mit Ethidium-Bromid (20 µl Ethidium-Bromid in 400 ml TBE-Puffer) für 25 min unter leichter Rotationsbewegung auf dem Schüttler. Schließlich wurden die aufgetrennten DNA-Banden mittels UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

2.2.6 Aufreinigung des Amplifikats

Die Aufreinigung des Amplifikats für die *spa*-Typisierung erfolgte mit Hilfe des GeneClean-Sets II nach einer Standartarbeitsanweisung. Dieses Kit besteht aus den drei Komponenten Glasmilch, NaI und New Wash.

Zunächst wurden 90 µl NaI, 5 µl Glassmilch und 30 µl Probe in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben, kurz gevortext und 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach ca. 10 s Zentrifugation bei 12000 rpm wurde der Überstand dekantiert, dem Pellet 1000 µl New Wash beigegeben und kurz gevortext. Nach ca. 10-sekündiger Zentrifugation bei 12000 rpm wurde der Überstand entfernt, erneut 10 Sekunden zentrifugiert und das restliche New Wash mit einer feinen Pipettenspitze entfernt. Anschließend wurde das Pellet in 10 µl HPLC – Wasser resuspendiert, für 10 Minuten bei 56°C inkubiert und für 10 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert. Als letzter Schritt wurde der Überstand in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank getrocknet.

Für das Multi Locus Sequence Typing erfolgte die Aufreinigung des Amplifikats unter Verwendung des QIAquick PCR Purifikation Kit nach einer Standartarbeitsanweisung. Zunächst wurden die in dem Kit mitgelieferten QIAquick-Säulen in die dafür vorgesehenen 2 ml Auffanggefäße gesteckt und anschließend 40 µl PCR-Probe sowie 200 µl PB-Puffer hineingegeben. Zur Bindung der in der Probe enthaltenen DNA an die in der Säule befindliche Silica-Gel Membran wurde die Säule für eine Minute bei 13000 rpm

zentrifugiert. Der Inhalt des Auffanggefäßes wurde verworfen. Für den anschließenden Waschgang wurden 0,75 ml PE-Puffer in die Säule gegeben und diese für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Um den restlichen Waschpuffer zu entfernen wurde das Auffanggefäß geleert und die Säule noch einmal bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde die Säule nun in ein sauberes 1,5 µl Reaktionsgefäß gegeben und nach Zugabe von 50 µl EB-Puffer für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert.

2.2.7 DNA - Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung für die *spa*-Typisierung wurde durch die MWG Biotech AG durchgeführt. Die Sequenzauswertung der Repeatregion erfolgte mit der Ridom StaphType Software (Ridom GmbH, Würzburg).

Die DNA-Sequenzierung für das Multi Locus Sequence Typing wurde durch den Sequenzierservice des Universitätsklinikum Eppendorf vorgenommen. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels des Programms Vector NTI Advance der Firma Invitrogen.

3. Ergebnisse

3.1 Langzeitverläufe

3.1.1 PFGE

Die Untersuchung der *In-Vivo*-Stabilität der X-Region des *spa*-Gens als genetischer Marker erfolgte anhand von Folgeisolaten dreier Patienten, bei denen über einen Zeitraum von mehreren Monaten (32, 45 bzw. 48 Monate) wiederholt MRSA in Haut-, Schleimhaut und Wundabstrichen nachgewiesen wurden (Patienten U.M., I.A., S.G., siehe Abbildung 3, 4, 5). Zunächst wurden diese Isolate mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese typisiert, um festzustellen, ob es sich bei den Isolaten eines Patienten tatsächlich jeweils um Folgeisolate desselben Klons handelt. Die Ergebnisse dieser Methode, die den bisherigen Goldstandard darstellt, sollten später mit denen der *spa*-Typisierung verglichen und festgestellt werden, ob sich die Ergebnisse in ihrer Stabilität unterscheiden. Bei der Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese wurden die Folgeisolate eines Patienten jeweils in fortlaufender Reihenfolge auf einem PFGE-Gel analysiert, um eine direkte visuelle Vergleichbarkeit der Muster zu ermöglichen. Insgesamt wurden so alle 20 Isolate erfolgreich mittels PFGE typisiert.

Die Analyse der PFGE-Muster der bei dem Patienten U.M. im Zeitraum von Dezember 2000 bis September 2004 in einem chronisch infizierten Ulcus nachgewiesenen Isolate (Abbildung 3) zeigte, dass im Vergleich zum Erstisolat (Isolat 1) bei einigen der folgenden Isolaten Bandenunterschiede auftraten (Isolate 2, 4 und 6), teilweise aber auch das gleiche Bandenmuster wieder auftrat (Isolate 3 und 5). Da bei diesen Isolaten maximal zwei Bandenunterschiede (Isolat 2) im Vergleich zum Ausgangsstamm auftraten, wurden sie nach den von Tenover aufgestellten Kriterien als mit hoher Wahrscheinlichkeit einem klonalen Komplex zugehörig klassifiziert.

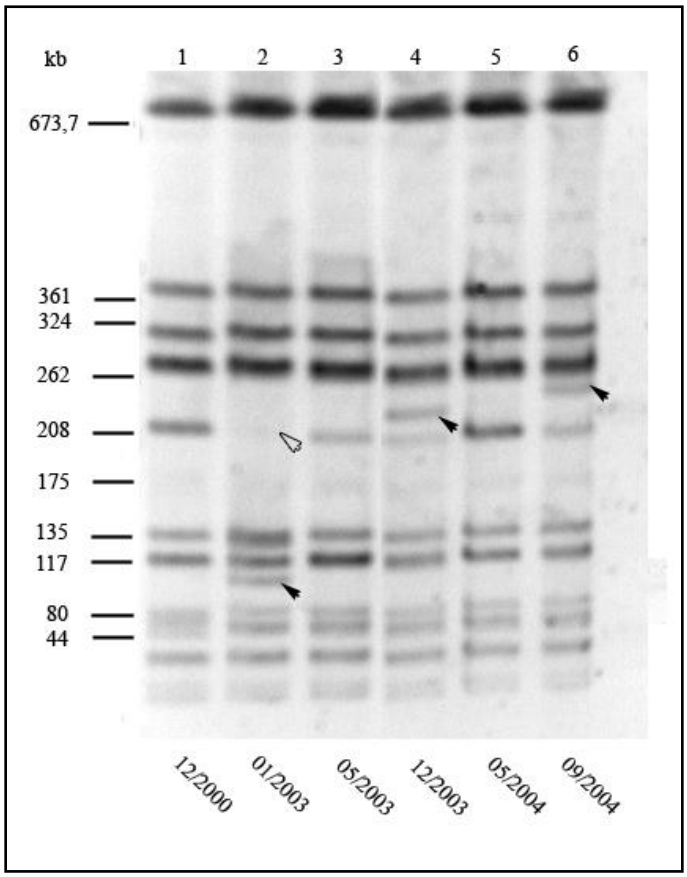

Abbildung 3: PFGE-Muster der bei Patient U.M. im Zeitraum von Dezember 2000 bis September 2004 nachgewiesenen Isolate. Im Vergleich zum Ursprungsmuster von Dezember 2000 weisen die Muster 2, 4 und 6 abweichende Banden auf. Die schwarzen Pfeile markieren neu hinzugekommene Banden, die transparenten Pfeile fehlende Banden.

Die PFGE-Muster der bei dem Patienten I.A. im Zeitraum von Januar 2000 bis Januar 2004 in Bindehaut und Nasenabstrichen nachgewiesenen MRSA-Isolate zeigten im Vergleich zu denen von Patient U.M ein weniger variables Bild (Abbildung 4). Die Isolate 1-6 offenbarten ein identisches PFGE-Muster. Erst bei den im September 2002 und Januar 2004 nachgewiesenen Isolaten 7 und 8 trat ein PFGE-Muster auf, welches im Vergleich zum Ausgangsmuster zwei Bandenunterschiede aufwies.

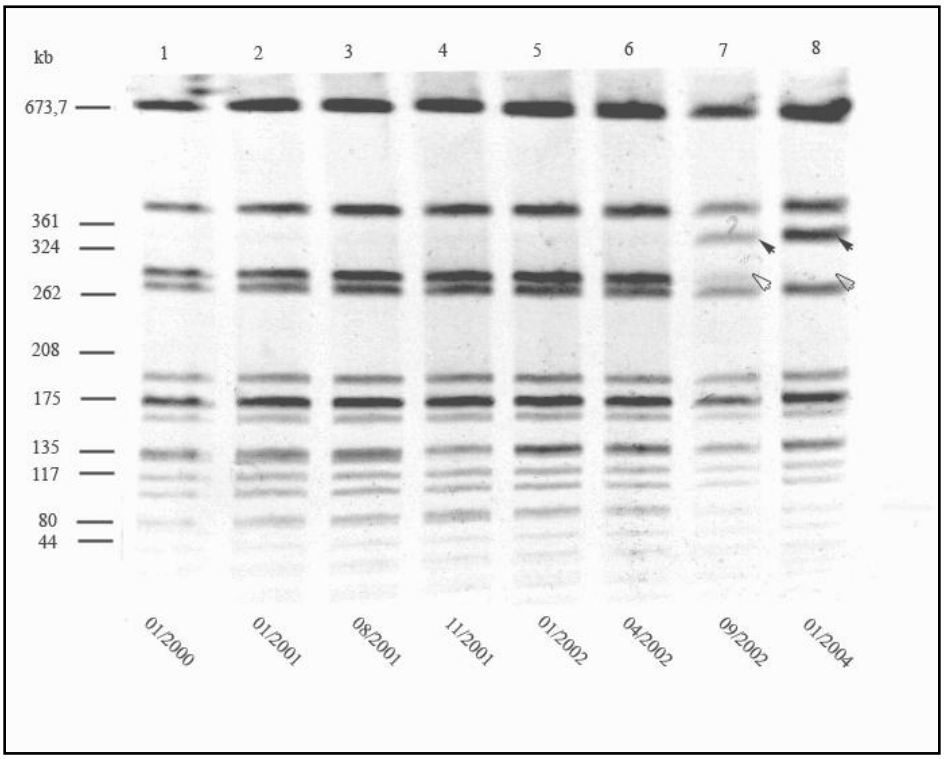

Abbildung 4: PFGE-Muster der bei Patient I.A. im Zeitraum von Januar 2000 bis Januar 2004 nachgewiesenen Isolate. Die ersten sechs Isolate haben ein identisches PFGE-Muster, die Isolate 7 und 8 zeigen je 2 Unterschiede. Die schwarzen Pfeile markieren neu hinzugekommene Banden, die transparenten Pfeile fehlende Banden.

Die dritte Gruppe untersuchter Isolate wurde aus verschiedenen Materialien (Rachen- und Analabstriche, Stuhl, Sputum) des Patienten S.G. gewonnen und stammen aus dem Zeitraum von Januar 2002 bis September 2004 (Abbildung 5). Die ersten fünf Isolate wiesen ein identisches PFGE-Muster auf. Erst Isolat 6, welches im September 2004 nachgewiesen wurde, zeigte ein Muster, das vier Bandenunterschiede zu den Vorgängern enthielt. Trotz dieser Veränderungen war die klonale Zughörigkeit dieses Isolats zu den übrigen Isolaten dieser Gruppe, aufgrund der übrigen Bandenverteilung deutlich.

Auch wenn bei allen drei Patienten Isolate vorkamen, die ein von den anderen Isolaten aus ihrer Gruppe leicht abweichendes PFGE-Muster aufwiesen, war in allen drei Fällen die Klonalität der Isolate einer Gruppe eindeutig, so dass alle Isolate in die weiteren Untersuchungen eingeschlossen wurden.

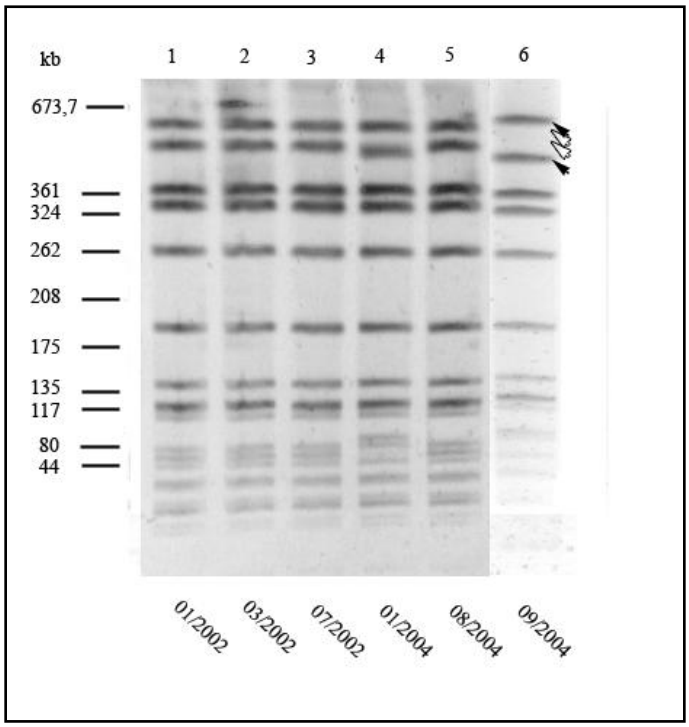

Abbildung 5: PFGE-Muster der bei Patient S.G. im Zeitraum von Januar 2002 bis September 2004 nachgewiesenen Isolate. Die ersten 5 PFGE-Muster sind identisch, das Muster von Isolat 6 wurde nachträglich eingefügt und weist vier Unterschiede auf, die mit Pfeilen markiert sind.

3.1.2 *spa*-Typisierung

Wie mit der Pulsfeldgelelektrophorese waren auch mit der *spa*-Typisierung alle 20 Isolate dieser Gruppe von Langzeitverläufen typisierbar. Dabei konnte allen Folgeisolaten desselben Patienten – mit einer Ausnahme – immer derselbe *spa*-Typ zugeordnet werden (Tabelle 8). Diese Ausnahme trat bei der Untersuchung der Isolate des Patienten U.M. zutage. Den ersten fünf Isolaten dieses Patienten konnte der *spa*-Typ t009 (Repeatfolge: 11-12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-25) zugeordnet werden. Dem sechsten Isolat jedoch konnte die Staphtype-Software zunächst keinen *spa*-Typ zuweisen, da es in dessen Sequenz zur Deletion einer Base im 13. Repeat gekommen war. Es zeigte sich aber, dass die Repeatfolge des Isolats, abgesehen von dieser Deletion, dem bei den anderen Isolaten ermittelten *spa*-Typ t009, identisch ist. Der *spa*-Typ t009 entspricht dem Hannoverschen Epidemiestamm. Zur Überprüfung der Verwandtschaft der untersuchten Isolate mit diesem Stamm, wurde mittels MLST exemplarisch für eines dieser Isolate der Sequenztyp ST 254 bestimmt, der ebenfalls dem Hannoverschen Epidemiestamm zugeordnet wird.

Für alle acht Isolate des Patienten I. A. wurde der *spa*-Typ t037 (Repeatfolge: 15-12-16-02-25-17-24) ermittelt. Dieser wurde bereits als *spa*-Typ des Wiener Epidemiestamms beschrieben, welchem durch MLST die Sequenztypen ST 239, ST 240 und ST 241 zugeordnet werden. Zur Bestätigung der Verwandtschaft der Isolate des Patienten I.A. mit dem Wiener Epidemiestamm konnte exemplarisch für eines der Isolate der Sequenztyp ST 241 ermittelt werden.

Auch den sechs Isolaten des Patienten S.G. konnte mit t030 (Repeatfolge: 15-12-16-02-24-24) ein identischer *spa*-Typ zugewiesen werden.

Tabelle 8: Übersicht über *spa*-Typen und Repeat-Sequenzen der Langzeitverläufe

Patient	*spa*-Typ	n	Repeat-Sequenz	Beobachtungs-zeitraum
U.M.	t009 tx	5 1	11-12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-25 11-12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-xx	45 Monate
I.A.	t037	8	15-12-16-02-25-17-24	48 Monate
S.G.	t030	6	15-12-16-02-24-24	32 Monate

3.2 In Hamburg endemische Klone

3.2.1 PFGE

In diesem Teil der Arbeit wurden Isolate der vier in Hamburg am häufigsten vorkommenden MRSA-Klone zunächst durch die Pulsfeldgelelektrophorese typisiert. Dieser Schritt diente dazu, die Zugehörigkeit der Isolate zu dem entsprechenden Klon zu sichern und mögliche Subtypen innerhalb eines Klons zu identifizieren. Diese Ergebnisse sollten später mit denen der *spa*-Typisierung verglichen werden um herauszufinden, ob mit der *spa*-Typisierung die gleichen klonalen Zusammenhänge gefunden werden und ob eine weitgehendere Subtypisierung innerhalb der Klone möglich ist.

Der Barnimer Epidemiestamm, welcher dem EMRSA-15 Klon entspricht, ist der in Hamburger Krankenhäusern am häufigsten isolierte MRSA-Klon. Zur Untersuchung dieses Klons wurden für den Zeitraum von 2000 bis 2004 insgesamt 57 Isolate ausgewählt. Die Auswahl erfolgte durch die Auswertung der routinemäßig für jedes Isolat angefertigten PFGE-Muster, wobei bis zu 6 Bandenabweichungen vom typischen Barnimer PFGE-Muster (A1) zugelassen wurden (Abbildung 6). Es wurden also für diese Untersuchung auch Isolate herangezogen, die nach den Tenover-Kriterien zur Interpretation von PFGE-

Mustern nur als möglicherweise einem Ausbruch zugehörig klassifiziert werden. Aufgrund dieser Auswahl fanden sich unter den 57 ausgewählten Isolaten des Barnimer Klons 48 Isolate mit PFGE-Mustern der Variante A1, 4 Isolate mit einem PFGE-Muster der Variante A2 und 3 Isolate der Variante A3. Bei genauer Betrachtung dieser Varianten zeigte sich, dass Variante A2 sich von Variante A1 in einer zusätzlichen Bande von etwa 100 kB unterschied. Die Variante A3 war im Vergleich zu A1 dadurch charakterisiert, dass eine Bande von etwa 208 kB fehlte, während zwei Banden mit einer Größe von etwa 135 kB bzw. 90 kB neu auftraten.

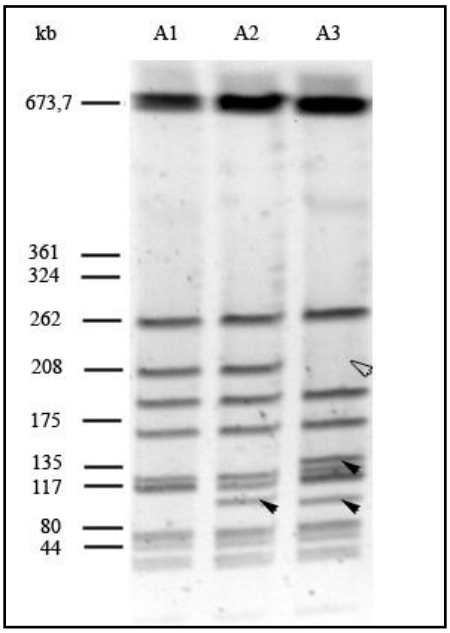

Abbildung 6: Repräsentative PFGE-Muster der Barnimer Subtypen (A1 bis A3). Das Muster A1 stellt die häufigste Variante dar. Im Vergleich zu diesem Muster weisen die Variante A2 einen Unterschied und die Variante A3 drei Unterschiede auf. Die schwarzen Pfeile markieren neu hinzugekommene Banden, die transparenten Pfeile fehlende Banden.

Der Berliner Epidemiestamm ist nach dem Barnimer Epidemiestamm der in Hamburg am zweithäufigsten isolierte MRSA-Stamm. Insgesamt 51 Isolate dieses Stamms wurden im Zeitraum von 2000 bis 2004 nach ihrem PFGE-Muster für diese Untersuchung ausgewählt. Bei Betrachtung der PFGE-Muster (Abbildung 7) fiel auf, dass im Vergleich zum Barnimer Epidemiestamm deutlich mehr Varianten gefunden wurden. Insgesamt sechs Varianten mit im Vergleich zum typischen Berliner Pulsfeldmuster (B1) bis zu acht Unterschieden waren in Hamburg bekannt. Die Isolate mit sieben (B2, B3, B7) bzw. acht Unterschieden (B6)

würden nach strenger Auslegung der Tenover-Kriterien nicht als Teil eines Ausbruchs klassifiziert werden. Aufgrund der dennoch deutlichen Ähnlichkeiten zum typischen PFGE-Muster B1, wurden sie trotzdem in diese Untersuchung einbezogen. Wie beim Barnimer Epidemiestamm fand sich auch hier nach dieser Auswahl mit 41 Isolaten der Variante B1 eine mit Abstand am häufigsten vorkommende PFGE-Variante, während alle anderen Varianten nur vereinzelt vorlagen (1x B2, 2x B3, 3x B4, 2x B5, 1x B6 und 1x B7).

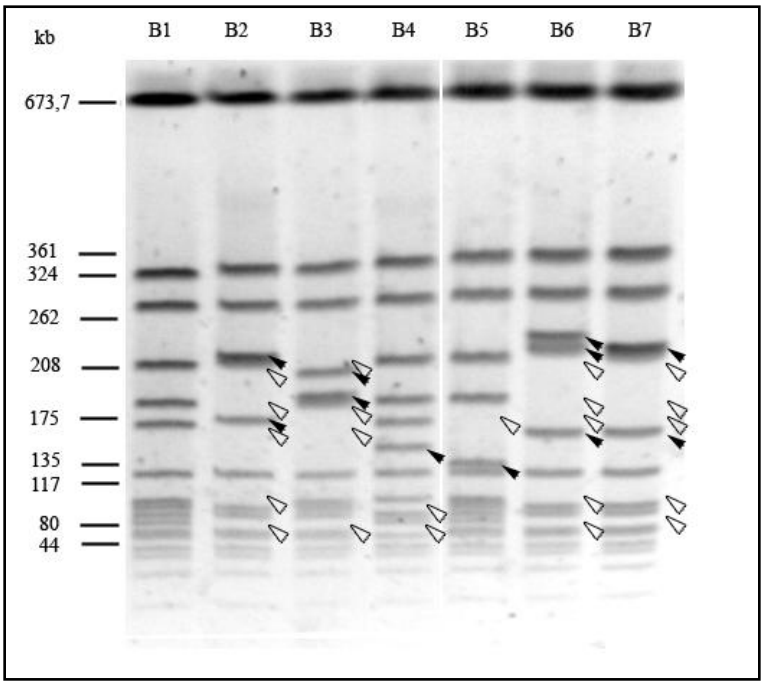

Abbildung 7: Repräsentative PFGE-Muster der Berliner Subtypen (B1 – B7). Im Vergleich zu Muster B1, welches die häufigste Variante darstellt, weisen Variante B2 sieben Unterschiede, B3 sechs Unterschiede, B4 drei Unterschiede, B5 zwei Unterschiede, B6 acht Unterschiede und B7 sieben Unterschiede auf. Die schwarzen Pfeile markieren neu hinzugekommene Banden, die transparenten Pfeile fehlende Banden.

Unter den in Hamburg nachgewiesenen Isolaten wurde immer wieder, wenn auch nicht so häufig wie der Berliner oder der Barnimer Epidemiestamm, ein weiterer, innerhalb des Instituts als „Hamburger“ bezeichneter Stamm, anhand seines charakteristischen Pulsfeldmusters identifiziert. Zur Untersuchung dieses Stammes wurden die im Zeitraum von Mai 2003 bis Dezember 2004 aufgetretenen 19 Isolate typisiert. Innerhalb des Hamburger Klons wurden zwei PFGE-Mustervarianten gefunden, die sich in drei Banden voneinander unterscheiden (Abbildung 8). In diesem Fall konnten die drei unterschiedlichen Banden sehr gut durch den Verlust einer Schnittstelle des

Restriktionsenzyms erklärt werden, da die addierten Größen der beiden in der Variante C2 fehlenden Fragmente in etwa der Größe des neu hinzugekommenen Fragments entsprachen. Wie beim Barnimer und Berliner Stamm fanden sich die Varianten der PFGE-Muster in unterschiedlichen Häufigkeiten. Die Variante C1 wurde unter den 19 untersuchten Isolaten 14-mal, die Variante C2 5-mal gefunden.

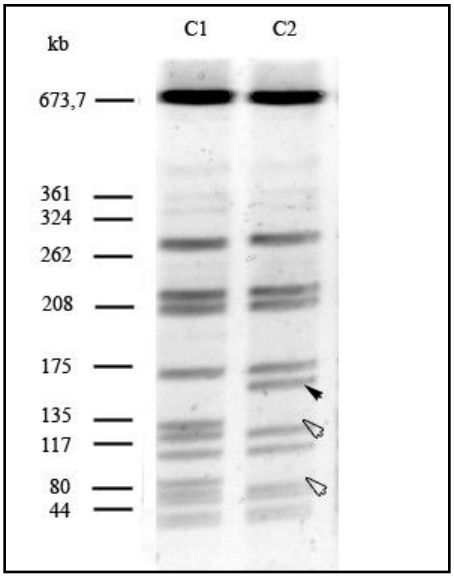

Abbildung 8: Repräsentative PFGE-Muster der Hamburger Subtypen (C1 und C2). Die Variante C1 wurde weitaus häufiger gefunden. Im Vergleich zu dieser zeigt die Variante C2 drei Unterschiede. Die schwarzen Pfeile markieren neu hinzugekommene Banden, die transparenten Pfeile fehlende Banden.

Zur Untersuchung des EMRSA-16 Stamms, der in Hamburg im Vergleich zu den anderen drei Stämmen weniger häufig vorkommt, wurden die 12 aufgetretenen Isolate aus dem Zeitraum von Februar 2002 bis April 2005 herangezogen. Bei der Analyse dieser Isolate fanden sich 6 PFGE-Mustervarianten, die sich nur geringfügig voneinander unterschieden (Abbildung 9). Unter ihnen wurde die Variante D1 am häufigsten gefunden. Im Vergleich zu dieser zeigten vier der Varianten nur jeweils zwei Unterschiede (D2, D3, D5 und D6). Diese Änderung der Fragmentgröße, welches in D1 bei 208 kB liegt, schien durch Deletionen unterschiedlich großer DNA-Abschnitte verursacht zu sein. Die Variante D4 zeigte neben dieser Veränderung ein zusätzliches Fragment in einer Größenordnung von etwa 500 kB. Die Variante D1 kam in der Gruppe untersuchter Isolate des EMRSA 16

Stamms am häufigsten vor (7-mal), während die anderen Varianten nur einmal (D2 bis D5) bzw. zweimal auftraten (D6).

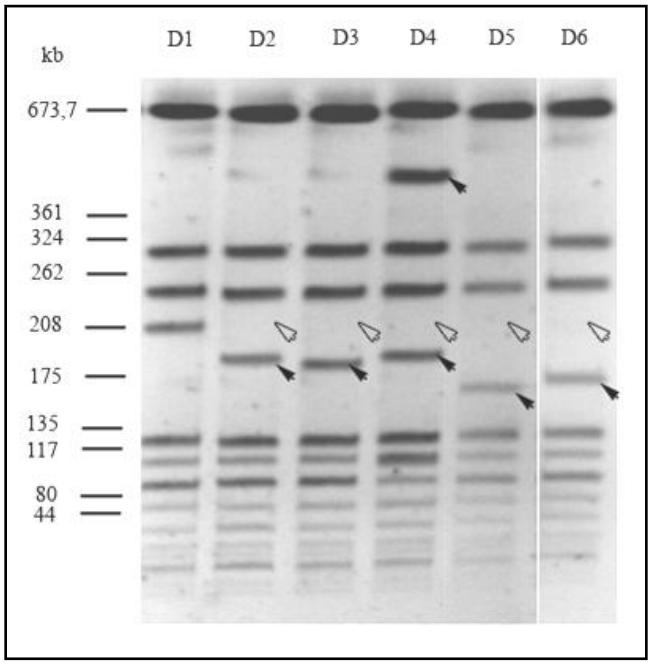

Abbildung 9: Repräsentative PFGE-Muster der EMRSA-16 Subtypen (D1 bis D5). Das PFGE-Muster D1 stellt den häufigsten Typ dar. Von diesem Muster weisen die Typen D2 zwei Unterschiede, D3 zwei Unterschiede, D4 drei Unterschiede und D5 zwei Unterschiede auf. Die schwarzen Pfeile markieren neu hinzugekommene Banden, die transparenten Pfeile fehlende Banden.

Bei allen vier untersuchten Klonen konnte mittels PFGE eine unter den ausgewählten Isolaten vorherrschende Variante gefunden werden. Neben dieser wurden aber bei den verschiedenen Klonen deutlich unterschiedlich viele Varianten gefunden. So wurden beim Berliner Klon sieben und beim EMRSA-16 Klon sechs Varianten gefunden, während beim Barnimer und beim Hamburger Klon nur drei bzw. zwei Varianten entdeckt wurden.

3.2.2 *spa*-Typisierung

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob mittels *spa*-Typisierung eine weitere Subtypisierung innerhalb der mit der Pulsfeldgelelektrophorese gefundenen Klone Barnim, Berlin, Hamburg und EMRSA-16 möglich ist, sollten die *spa*-Typen für diese Isolate ermittelt werden. Allen insgesamt 139 Isolaten dieser Gruppe konnte mittels *spa*-Typisierung ein *spa*-Typ zugeordnet werden.

Die Typisierung der 57 Isolate, die mit der Pulsfeldgelelektrophorese dem Barnimer Epidemiestamm zugeordnet wurden, erbrachte drei verschiedene *spa*-Typen. Unter ihnen war der *spa*-Typ t032 der häufigste (55 Isolate) und wurde bereits als Prototyp des Barnimer Epidemiestamms beschrieben. Die beiden anderen *spa*-Typen t022 und t1474 wurden je einmal gefunden. Die Verwandtschaft dieser drei *spa*-Typen wurde bei Betrachtung ihrer Repeatfolge deutlich (Abbildung 10A). Auch der BURP-Algorithmus ordnete diese *spa*-Typen einem Cluster zu. Der *spa*-Typ t022 unterschied sich von t032 durch das Fehlen eines kompletten Repeats an Position 3. Der *spa*-Typ t1447 dagegen war wie t032 aus sechzehn Repeats aufgebaut, zeigt aber an neunter Position ein abweichendes Repeat. Dieses Repeat 25 unterschied sich von Repeat 31, das sich im *spa*-Typ t032 an der entsprechenden Position befindet, durch eine Punktmutation in der letzten Base (Abbildung 10B). Die Zuordnung der Ergebnisse der *spa*-Typisierung zu denen der Pulsfeldgelelektrophorese zeigte, dass die Subtypen der beiden Methoden nicht miteinander korrelieren (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verteilung der *spa*-Typen und PFGE-Muster im Barnimer Klon

	t032	**t022**	**t1447**	**gesamt**
A1	48	1	0	**49**
A2	4	0	1	**5**
A3	3	0	0	**3**
gesamt	**55**	**1**	**1**	**57**

A

```
t032 (55):    26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
t022  (1):    26-23-  -13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
t1447 (1):    26-23-23-13-23-31-29-17-25-29-17-25-17-25-16-28
```

B

```
Repeat 31:    AAAGAAGATGGCAACAAACCTGGC
Repeat 25:    AAAGAAGATGGCAACAAACCTGGT
```

Abbildung 10: A: Innerhalb des Barnimer Klons gefundene *spa*-Typen. Der *spa*-Typ t032 ist aus 16 Repeats aufgebaut und stellt innerhalb dieses Klons den häufigsten *spa*-Typ dar. Im Vergleich zu diesem fehlt dem *spa*-Typ t022 ein Repeat, während der *spa*-Typ t1447 durch ein unterschiedliches Repeat an neunter Position gekennzeichnet ist. Rot markiert ist ein Repeat, das in t032 an dieser Position nicht vorkommt. B: Vergleich der Repeats Nr. 31 und Nr. 29, welche in den *spa*-Typen t032 bzw. t1447 an neunter Position vorkommen. Die beiden Repeats unterscheiden sich nur durch eine Punktmutation in der 24. Base. Rot markiert ist die unterschiedliche Base.

Innerhalb des Berliner Epidemiestamms fand sich mit der Pulsfeldgelelektrophorese eine große Vielfalt an Varianten (6 Varianten). Eine ähnliche Vielfalt erbrachte auch die *spa*-Typisierung dieser Isolate. Für alle 51 Isolate dieses Stammes konnte erfolgreich ein *spa*-Typ ermittelt werden, wobei acht verschiedene *spa*-Typen entdeckt wurden. Unter diesen konnte der *spa*-Typ t004, mit insgesamt 41 Isolaten, die diesen *spa*-Typ aufwiesen, am häufigsten nachgewiesen werden. Ausgehend von *spa*-Typ t004 zeigten die anderen gefundenen *spa*-Typen Unterschiede auf, die auf Verluste und Duplikationen ganzer Repeats, wie auch auf Punktmutationen zurückzuführen waren (Abbildung 11). So zeigte der *spa*-Typ t533 im Vergleich zu t004 eine Deletion des zweiten Repeats, während es beim *spa*-Typ t266 augenscheinlich zu einer Duplikation des fünften Repeats gekommen war. Der *spa*-Typ t065 dagegen zeigte mit Repeat 34 an vierter Position ein im Vergleich zu t004 in seiner Sequenz abweichendes Repeat. Beim Vergleich dieser beiden Repeats (Repeat 34 und 13), wurde deutlich, dass diese Abweichung durch nur eine unterschiedliche Base hervorgerufen wurde. Die übrigen vier *spa*-Typen zeigten deutlich

größere Unterschiede zu t004 auf. So offenbarten die *spa*-Typen t015 und t065 auf Repeatebene jeweils drei Unterschiede zu t004. Bei t015 stand an erster Stelle das Repeat 8, welches sich in drei Basen von Repeat 9 des *spa*-Typs t004 unterschied. Zusätzlich war t015 durch den bereits aus t065 bekannten Repeataustausch, sowie durch das Vorhandensein des zusätzlichen Repeats 16 an zweiter Position charakterisiert, wodurch es im Vergleich zu t004 um ein Repeat länger war. Der *spa*-Typ t1238 war t015 sehr ähnlich und unterschied sich nur durch das an zweiter Position stehende Repeat 104. Dieses wiederum zeigte im Vergleich zu Repeat 16 nur eine unterschiedliche Base auf. Die übrigen beiden *spa*-Typen t550 und t362 waren durch die Deletion von 4 bzw. 7 Repeats gekennzeichnet. Im Fall von t362 war der Unterschied zu t004 so groß, dass es fraglich war, ob diese Stämme bei alleiniger *spa*-Typisierung dem gleichen klonalen Komplex zugeordnet worden wären. Der *spa*-Typ t550 hatte zusätzlich zu der großen Deletion das bereits bekannte Repeat 9 an erster Position. Wie beim Barnimer Epidemiestamm korrelierten auch hier die Ergebnisse der *spa*-Typisierung bezüglich der Identifikation von Subtypen nicht mit denen der Pulsfeldgelelektrophorese (Tabelle 10).

Tabelle 10: Verteilung der *spa*-Typen und PFGE-Muster im Berliner Klon

	t004	**t015**	**t065**	**t266**	**t362**	**t533**	**t550**	**t1238**	**gesamt**
B1	38	0	1	1	0	1	0	0	**41**
B2	0	0	0	0	0	0	1	0	**1**
B3	1	0	0	0	1	0	0	0	**2**
B4	3	0	0	0	0	0	0	0	**3**
B5	1	1	0	0	0	0	0	0	**2**
B6	0	0	0	0	0	0	0	1	**1**
B7	0	0	0	0	0	0	0	1	**1**
gesamt	**43**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**2**	**51**

```
A

t533  (1):   09-       -16-13-13-  -17-34-16-34
t266  (1):   09-   -02-16-13-13-13-17-34-16-34
t004 (43):   09-   -02-16-13-13-  -17-34-16-34
t065  (1):   09-   -02-16-34-13-  -17-34-16-34
t015  (1):   08-16 -02-16-34-13-  -17-34-16-34
t1238 (2):   08-104-02-16-34-13-  -17-34-16-34
t550  (1):   08-                  -17-34-16-34
t362  (1):   09-                            -34

B

Repeat 13:   AAAGAAGACAACAACAAACCTGGT
Repeat 34:   AAAGAAGACAACAAAAAACCTGGT

Repeat 9:    GAGGAAGACGGCAACAAACCTGGT
Repeat 8:    GAGGAAGACAACAACAAGCCTGGT
Repeat 16:   AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGT


Repeat 16:   AAAGAAGACGGCAACAAACCTGGT
Repeat 104:  AAAGAAGGCGGCAACAAACCTGGT
```

Abbildung 11: A: Innerhalb des Berliner Klons ermittelte *spa*-Typen. Der *spa*-Typ t004 wurde am häufigsten gefunden. Von diesem unterscheiden sich die *spa*-Typen t533, t266 und t362 nur durch den Verlust, bzw. den Zugewinn eines oder mehrerer Repeats. Der *spa*-Typ t065 zeigt dagegen die gleiche Anzahl an Repeats, dafür aber einen verändertes viertes Repeat. Alle übrigen *spa*-Typen zeigen sowohl Unterschiede in der Anzahl der Repeats als auch Unterschiede innerhalb eines oder mehrerer Repeats. Rot markiert sind Repeats, die in t004 an der entsprechenden Position nicht vorkommen. B: Vergleich verschiedener Repeats. Die Repeats Nr. 13 (aus t004) und Nr. 34 (aus t061, t015 und t1238) unterscheiden sich nur in einer Base. Das Repeat Nr. 9 (aus t004) unterscheidet sich von Repeat Nr. 8 (aus t015, t1238 und t550) in 3 Basen und von Repeat Nr. 16 (aus t015) in 2 Basen. Das Repeat Nr. 16 (aus t015) unterscheidet sich von Repeat Nr. 104 (aus t1238) in einer Base. Rot markiert sind Basen, die sich von der ersten Basenfolge aus jedem Block unterscheiden.

Die *spa*-Typisierung der 19 Isolate des Hamburger Klons konnte bei allen Isolaten erfolgreich durchgeführt werden und ergab drei verschiedene *spa*-Typen, deren Verwandtschaft bei Betrachtung ihres Aufbaus deutlich wurde (Abbildung 12). Unter den ermittelten *spa*-Typen wurde t431 mit 14 Isolaten dieses Typs am häufigsten gefunden. Die beiden anderen *spa*-Typen t1436 und t1437, die jeweils einmal auftraten, unterscheiden sich von t431 durch das Fehlen von einem (t1436) bzw. drei Repeats (t1437) an Position 2 bzw. 7 – 9. Auch bei diesem Klon zeigte sich, dass die *spa*-Typisierung einen *spa*-Typ mit Abstand am häufigsten ermittelte und dass eine vergleichbare Anzahl an Varianten wie in der Pulsfeldgelelektrophorese (2 Varianten) gefunden wurde. Wiederum lassen sich die gefundenen *spa*-Typen nicht mit den PFGE-Varianten korrelieren (Tabelle 11).

```
t431 (17):    26-23-31-29-17-25-17-25-25-16-28
t1436 (1):    26-  -31-29-17-25-17-25-25-16-28
t1437 (1):    26-23-31-29-17-25-        -16-28
```

Abbildung 12: Innerhalb des Hamburger Klons ermittelte *spa*-Typen. Der *spa*-Typ t431 ist aus 11 Repeats aufgebaut und stellt den häufigsten *spa*-Typ innerhalb dieses Klons dar. Die *spa*-Typen t1436 und t1437 unterscheiden sich von diesem durch den Verlust von einem bzw. zwei Repeats.

Tabelle 11: Verteilung der *spa*-Typen und PFGE-Muster im "Hamburger" Klon

	t431	**t1446**	**t1447**	**gesamt**
C1	12	1	1	**14**
C2	5	0	0	**5**
gesamt	**17**	**1**	**1**	**19**

Bei Untersuchungen eventueller Verwandtschaften verschiedener *spa*-Typen mittels des BURP-Algorithmus der Staphtype-Software fiel auf, dass zwischen dem unter den untersuchten „Hamburger“-Isolaten am häufigsten identifizierten *spa*-Typ t431 und dem für den Barnimer Klon typischen *spa*-Typ t032 eine gewisse Verwandtschaft bestand (Abbildung 13). Diese Verwandtschaft beruhte auf drei übereinstimmenden Repeatsequenzen, die in beiden *spa*-Typen auftraten. Da sich die beiden *spa*-Typen aber sowohl in der Anzahl der Repeats (t032: 16 Repeats, t431: 11 Repeats) als auch in ihrer

Abfolge im Bereich der Repeats an 11. bis 13. Position unterschieden, wurde die fragliche Klonalität der beiden Stämme mittels Multilocus Sequence Typing überprüft. Der *spa*-Typ t032 wurde bereits als Prototyp für den Sequenztyp ST-22 beschrieben. Dem *spa*-Typ t431 wurde bislang noch kein Sequenztyp zugeordnet, weshalb an einem Isolat dieses *spa*-Typs exemplarisch der Sequenztyp ermittelt wurde. Es zeigte sich ebenfalls ST-22, wodurch die Verwandtschaft der beiden Stämme bestätigt ist.

```
T032:    26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
T431:    26-23-        -31-29-17-     -25-17-25-25-16-28
```

Abbildung 13: Vergleich des für den Barnimer Epidemiestamm typischen spa-Typ t032 mit dem spa-Typ t431 des „Hamburger“ Klons. Rot markiert sind die Repeats die in t032 an entsprechender Position nicht vorkommen.

Auch die *spa*-Typisierung der dem EMRSA-16 Klon zugeordneten Isolate verlief bei allen 12 untersuchten Isolaten erfolgreich. Hierbei wurden 3 deutlich miteinander verwandte *spa*-Typen identifiziert (Abbildung 14), während mittels PFGE 5 Varianten unterschieden werden konnten. Unter ihnen wurde der *spa*-Typ t018 am häufigsten gefunden und auch schon als Prototyp für den EMRSA-16 Klon beschrieben. Die anderen beiden *spa*-Typen t021 und t1239 unterschieden sich von diesem jeweils durch das Fehlen zweier aufeinander folgender Repeats. Wie auch bei den drei anderen untersuchten Stämmen, konnte auch hier sowohl mit der PFGE als auch mit der *spa*-Typisierung eine quantitativ dominierende Variante gefunden werden und wiederum können die gefundenen Varianten nicht miteinander korreliert werden (Tabelle 12).

```
t018  (8): 15-12-16-02-16-02-25-17-24-24-24
t021  (3): 15-12-16-02-16-02-25-17-24
t1239 (1): 15-12-16-02-16-02-     -24-24-24
```

Abbildung 14: Innerhalb des EMRSA-16 Klons ermittelte *spa*-Typen. Der *spa*-Typ t018 wurde am häufigsten innerhalb dieses Klons gefunden und setzt sich aus 11 Repeats zusammen. Die anderen beiden gefundenen *spa*-Typen T021 und T1239 unterscheiden sich von diesem durch den Verlust von jeweils zwei Repeats.

Tabelle 12: Verteilung der *spa*-Typen und PFGE-Muster im EMRSA-16 Klon

	t018	**t021**	**t1239**	**gesamt**
D1	5	2	0	**7**
D2	0	1	0	**1**
D3	1	0	0	**1**
D4	0	0	1	**1**
D5	2	0	0	**2**
gesamt	**8**	**3**	**1**	**12**

3.3 Sporadische Isolate

3.3.1 PFGE, *spa*-Typisierung und MLST

In diesem Teil der Arbeit sollte anhand von 21 sporadischen Isolaten untersucht werden, ob Isolate, die durch ihre PFGE-Muster eindeutig nicht als klonal erkannt werden, möglicherweise in der *spa*-Typisierung als identisch erkannt werden und somit klonal fehlklassifiziert würden. Weiter sollte herausgefunden werden, ob sich mit den beiden Methoden Verwandtschaften zwischen den hier untersuchten sporadischen Isolaten finden lassen und wie in einem solchen Fall die Ergebnisse der beiden Methoden miteinander korrelieren. Die Auswahl der Isolate erfolgte durch visuelle Analyse der bereits vorhandenen PFGE-Muster aus der Routinediagnostik. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Isolate möglichst wenig Übereinstimmungen mit den vier in Hamburg am häufigsten vorkommenden Klonen Barnim, Berlin, EMRSA-16 und Hamburg aufweisen. Die 21 so selektierten sporadisch vorkommenden Isolate wurden zunächst mittels *spa*-Typisierung und Pulsfeldgelelektrophorese analysiert. Bei der Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese wurden für die Anordnung der Isolate auf den PFGE-Gelen die Ergebnisse der vorher durchgeführten *spa*-Typisierung berücksichtigt, so dass die hierbei als identisch oder verwandt erkannten Isolate zur besseren Vergleichbarkeit in Gruppen nebeneinander platziert werden konnten. Aufgrund der mitunter schwierigen Interpretierbarkeit der PFGE-Muster und der teilweise diskrepanten Clusterbildung von *spa*-Typisierung und PFGE wurde exemplarisch für ein Isolat jedes *spa*-Typs der MLST-Sequenztyp bestimmt. Da das MLST die Referenzmethode für die Untersuchung der Verwandtschaft solcher epidemiologisch nicht in Beziehung stehender Isolate darstellt, sollte so die tatsächliche Verwandtschaft der Isolate aufgeklärt werden. Erst im Vergleich zu diesen Ergebnissen war die definitive Bewertung der mittels *spa*-Typisierung und PFGE ermittelten Cluster möglich. Beim MLST werden Isolate, die auf fünf oder mehr Genorten identische Allele aufweisen als verwandt angesehen (Abbildung 17).

Mit der *spa*-Typisierung konnte für alle 21 untersuchten sporadischen Isolate erfolgreich ein *spa*-Typ ermittelt werden, wobei 15 verschiedene *spa*-Typen gefunden wurden. Drei *spa*-Typen traten dabei bei mehr als einem Isolat auf (t008 und t037 je dreimal, t044 und t110 je zweimal), alle anderen traten nur einmal auf. Durch manuelle Vergleiche der

Repeatmuster der gefundenen *spa*-Typen wurden fünf Gruppen von möglicherweise verwandten Isolaten (Cluster 1–5) zusammengestellt. 19 der untersuchten Isolate entfielen auf diese Cluster. Zwei Isolate zeigten keine Übereinstimmungen zu anderen Isolaten und wurden als Singletons klassifiziert. Entsprechend dieser manuellen Clusterbildung wurden die Isolate auf dem Agarosegel für die Pulsfeldgelelektrophorese angeordnet (Abbildung 15 und Abbildung 16). Neben der manuellen Clusterbildung wurde zur Evaluation der BURP-Funktion der StaphType-Software eine Clusteranalyse unter Verwendung dieser Funktion durchgeführt. Hierbei wurden für die benutzerdefinierten Parameter der BURP-Funktion diejenigen Werte verwendet, für welche Mellmann et al. die höchste Konkordanz zum MLST zeigen konnten [66].

A

1.	T305:	11- -12-21-17-34-24-34 -24-34-22- -25	Cluster 1
2.	T051:	11-19-21-12-21-17-34-24-34-22- -25	Cluster 1
3.	T009:	11- -12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-25	Singleton
4.	T008:	11-19- -12-21-17-34-24-34-22- -25	Cluster 1
5.	T008:	11-19- -12-21-17-34-24-34-22- -25	Cluster 1
6.	T008:	11-19- -12-21-17-34-24-34-22- -25	Cluster 1
7.	T1483:	123-12-02-16-02-25-17-24-24-24-24	Singleton
8.	T037:	15 -12- -16-02-25-17-24	Cluster 2
9.	T037:	15 -12- -16-02-25-17-24	Cluster 2
10.	T037:	15 -12- -16-02-25-17-24	Cluster 2
11.	T432:	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16	Cluster 3
12.	T032:	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28	Cluster 3
13.	T431:	26-23- -31-29-17- -25-17-25-25-16-28	Singleton

B

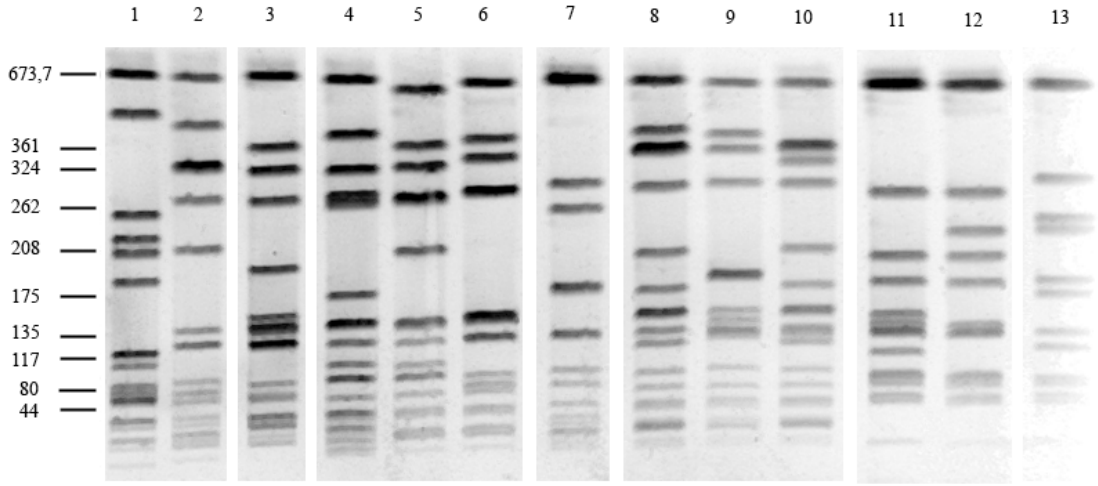

Abbildung 15: A: Ergebnisse der *spa*-Typisierung. *spa*-Typen mit Ähnlichkeiten im Repeatmuster sind blockweise zusammengefasst. In der rechten Spalte sind die BURP-Ergebnisse abzulesen. Abweichende Repeats sind rot markiert. B: PFGE-Muster von 12 sporadischen Isolaten. Die Isolate sind entsprechend der manuell gebildeten Cluster, die sich aus der *spa*-Typisierung ergeben haben, angeordnet. Bahn 12 zeigt das PFGE-Muster des Barnimer Epidemiestamms.

A

14.	T044:	07-23-12-34-34-33-34	Cluster 4
15.	T044:	07-23-12-34-34-33-34	Cluster 4
16.	T084:	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23	Singleton
17.	T127:	07-23-21-16-34-33-13	Singleton
18.	T110:	26-30-17- 12-17-16	Cluster 5
19	T110:	26-30-17- -12-17-16	Cluster 5
20.	T041:	26-30-17-34-17-20-17-34-17-20-17-12-17-16	Singleton
21.	T186:	07-12-21-17-13-13-34-34-33-34	Singleton
22.	T435:	14-44-13-17-17-17-23-18-17	Singleton

B

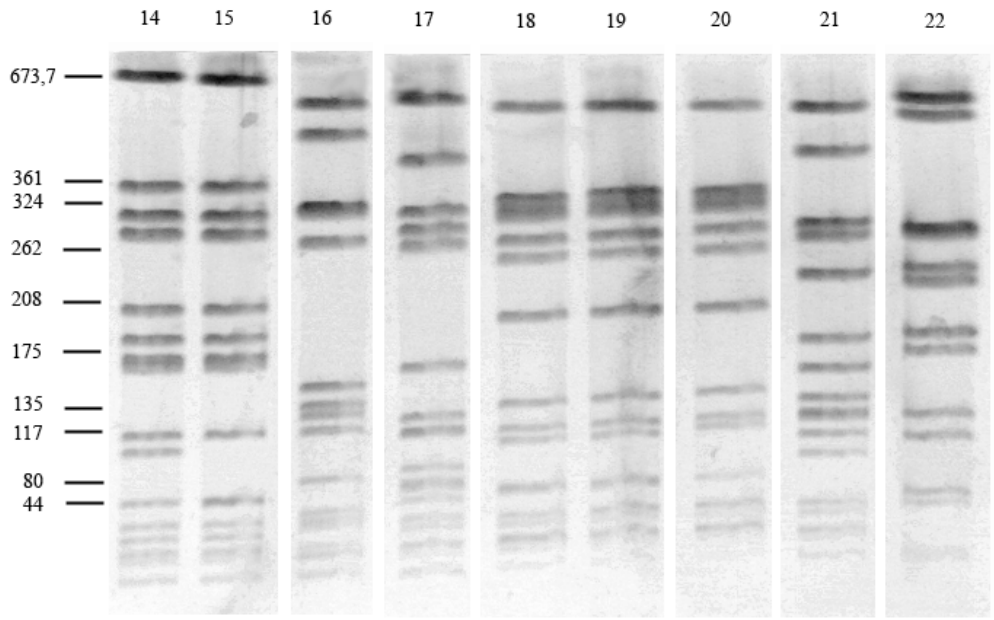

Abbildung 16: A: Ergebnisse der *spa*-Typisierung. *spa*-Typen mit Ähnlichkeiten im Repeatmuster sind blockweise zusammengefasst. In der rechten Spalte sind die BURP-Ergebnisse abzulesen. Abweichende Repeats sind rot markiert. B: PFGE-Muster von 9 sporadischen Isolaten. Die Isolate sind entsprechend der Cluster, die sich aus der *spa*-Typisierung ergeben haben, angeordnet.

Dem anhand der Ergebnisse der *spa*-Typisierung manuell erstellten Cluster 1 wurden insgesamt sechs Isolate zugeordnet, von denen drei den *spa*-Typ t008 und je eines den *spa*-Typ t009, t051 bzw. t305 aufwiesen. Die Anzahl der Repeats dieser *spa*-Typen variierte zwischen 10 und 13 Repeats. Allen *spa*-Typen war das Repeat 11 an erster und das Repeat 25 an letzter Stelle, sowie eine aus 6 Repeats bestehende Sequenz im Mittelteil (12-21-17-34-24-34) gemein. Die Analyse der Isolate dieses Clusters mit der BURP-Funktion identifizierte Isolat 3 (t009) als Singleton. Die übrigen Isolate des Clusters wurden auch durch die BURP-Funktion einem Cluster zugeordnet. Dieses Bild spiegelte sich nicht in den Ergebnissen der Pulsfeldgelelektrophorese wieder. Hier zeigten die PFGE-Muster des Isolats 3 (t009) und der Isolate 4 – 6 (t008) verwandte Bandenverteilungen. Die PFGE-Muster der Isolate 1 (t305) und 2 (t051) grenzten sich deutlich von diesen ab und zeigten auch untereinander keine Übereinstimmung. Analog zu den Ergebnissen der Pulsfeldgelelektrophorese ergab das MLST für die Isolate 3 und 4 mit ST 254 einen identischen Sequenztyp. Für die Isolate 1 (t305) und 2 (t051) dagegen fanden sich mit ST 617 und ST 247 zwei Sequenztypen, die in nur einem bzw. vier Allelen mit ST 254 übereinstimmten und auch untereinander nur ein Allel gemeinsam hatten. Diese Ergebnisse zeigen, dass der BURP-Algorithmus in diesem Fall anhand der *spa*-Typen zwei nicht-verwandte Isolate (1 und 2) einem Cluster zugeordnet hatte, während das Isolat 3 (t009), für welches die Zugehörigkeit zu diesem Cluster mittels MLST bewiesen wurde, nicht diesem Cluster zugeordnet wurde.

Das manuell erstellte *spa*-Cluster 2 umfasste vier Isolate, von denen drei den *spa*-Typ t037 aufwiesen. Das übrige Isolat 7 zeigte den *spa*-Typ t1483, der sich von t037 durch ein abweichendes Repeat an erster Stelle sowie durch vier zusätzliche Repeats unterschied. Aufgrund dieser Unterschiede wurden die *spa*-Typen durch den BURP-Algorithmus als nicht verwandt klassifiziert. In diesem Fall korrelierten die Ergebnisse der Pulsfeldgelelektrophorese gut mit denen der *spa*-Typisierung. Nur die Isolate 8 – 10 (t037) wiesen verwandte Bandenmuster auf, während sich das Muster von Isolat 7 (t1483) deutlich von diesen unterschied. Die Analyse der MLST-Allelprofile der Isolate des Clusters 2 zeigte, dass der Sequenztyp ST 30 des Isolats 7 (t1483) nur ein übereinstimmendes Allel mit dem Sequenztyp ST 241 hatte, welcher exemplarisch für eines der drei Isolate des *spa*-Typs t037 ermittelt wurde.

Das manuell erstellte Cluster 3 bestand aus zwei Isolaten mit den *spa*-Typen t431 und t432. Beide *spa*-Typen zeigten Ähnlichkeiten zum *spa*-Typ t032 des Barnimer Epidemiestamms. Besonders das Repeatmuster von t432 unterschied sich von t032 nur durch das Fehlen des letzten Repeats, während t431 im Vergleich zu t032 fünf Repeats fehlten und zusätzlich drei abweichende Repeats auftraten. Diese Abweichungen führten dazu, dass die BURP-Funktion den *spa*-Typ t431 nicht diesem Cluster zuordnete. In diesem Cluster korrelierten die Ergebnisse der Pulsfeldgelelektrophorese sehr gut mit denen der *spa*-Typisierung. So zeigte das Bandenmuster von Isolat 11 (t432) nur drei Bandenunterschiede zum typischen Barnimer PFGE-Muster (Isolat 12: Barnim Klon als Vergleich eingefügt). Dagegen zeigte das Bandenmuster von Isolat 13 (t431) analog zu den Ergebnissen der *spa*-Typisierung deutlich größere Unterschiede zum typischen Barnimer PFGE-Muster. Die Verwandtschaft der zwei sporadischen Isolate bestätigte sich auch im MLST, welches für das Isolat mit dem *spa*-Typ t431 den Sequenztyp ST22 und für das Isolat mit dem *spa*-Typ t432 den Sequenztyp ST1037 ergab, der sich in nur einem Allel von ST22 unterschied. In diesem Cluster 3 wurde also Isolat 13 (t431) durch die BURP-Funktion ausgegliedert und auch durch die PFGE nicht eindeutig dem Cluster zugeordnet, während das MLST die Verwandtschaft dieser Isolate eindeutig bestätigte.

Im manuell zusammengestellten *spa*-Cluster 4 fanden sich vier Isolate von denen zwei den *spa*-Typ t044 und die übrigen zwei Isolate die *spa*-Typen t084 und t127 aufweisen. Der BURP-Algorithmus hatte diese *spa*-Typen aufgrund zu großer Unterschiede im Repeatmuster nicht als verwandt klassifiziert. Die Pulsfeldgelelektrophorese bestätigte diese BURP-Klassifikation und zeigte nur für die beiden Isolate mit dem *spa*-Typ t044 ein fast identisches Bandenmuster, während die Bandenmuster der Isolate mit den *spa*-Typen t084 und t127 deutlich aus diesem Cluster herausfielen. Entsprechend zeigten auch die Ergebnisse des MLST mit ST80 (t044), ST15 (t084) und ST1 (t127) Sequenztypen, die in maximal zwei Allelen übereinstimmten, sodass eine Verwandtschaft dieser Isolate ausgeschlossen wurde.

Ein anderes Bild präsentierte sich innerhalb des ebenfalls manuell erstellten *spa*-Clusters 5. Der diesem Cluster zugeordnete *spa*-Typ t041 (1 Isolat) unterscheidet sich von t110 (2 Isolate) in einem abweichenden Repeat sowie acht zusätzlichen Repeats, was allenfalls auf eine entfernte Verwandtschaft dieser Isolate schließen lässt. Folglich wurden diese *spa*-

Typen auch durch die BURP-Funktion nicht als verwandt erkannt. Die Pulsfeldgelelektrophorese dagegen zeigte ein identisches Bandenmuster für alle drei Isolate dieses Clusters. Ebenso zeigten auch die Ergebnisse des MLST eine eindeutige Verwandtschaft zwischen Isolaten des *spa*-Typs t041 und t110. Die entsprechenden Sequenztypen ST228 und ST111 wiesen nur ein unterschiedliches Allel auf. In diesem Cluster wurden also mittels PFGE und MLST eindeutig als verwandt identifizierte Isolate mittels *spa*-Typisierung und BURP-Algorithmus als nicht verwandt fehlklassifiziert.

Die Isolate 21 und 22 mit den *spa*-Typen t186 und t435 wurden sowohl durch manuelle Analyse der Repeatsequenzen als auch durch die BURP-Funktion eindeutig als Singletons identifiziert. Diese Klassifikation wurde durch die PFGE-Muster, welche keine Übereinstimmungen zu anderen Mustern dieser Gruppe aufzeigten, bestätigt, weshalb auf eine weitere Bestätigung mittels MLST verzichtet wurde.

1.	t305	ST617	03-14-08-06-10-03-02	Cluster 1
2.	t051	ST247	03-03-01-12-04-04-16	Cluster 1
3.	t009	ST254	03-32-01-01-04-04-03	Singleton
4.	t008	ST254	03-32-01-01-04-04-03	Cluster 1
5.	t008	-----	----------	Cluster 1
6.	t008	-----	----------	Cluster 1
7.	t1483	ST 30	02-02-02-02-06-03-02	Singleton
8.	t037	-----	----------	Cluster 2
9.	t037	ST241	02-03-01-01-04-04-30	Cluster 2
10.	t037	-----	----------	Cluster 2
11.	t432	ST1037	07-59-01-05-08-08-06	Cluster 3
12.	t032	ST 22	07-06-01-05-08-08-06	Cluster 3
13.	t431	ST 22	07-06-01-05-08-08-06	Singleton
14.	t044	-----	----------	Cluster 4
15.	t044	ST 80	01-03-01-14-11-51-10	Cluster 4
16.	t084	ST 15	13-13-01-01-12-11-13	Singleton
17.	t127	ST 1	01-01-01-01-01-01-01	Singleton
18.	t110	ST228	01-04-01-04-12-24-29	Cluster 5
19.	t110	-----	----------	Cluster 5
20.	t041	ST111	01-04-01-04-46-24-29	Singleton

Abbildung 17: MLST, Übersicht über die Sequenztypen und Allelprofile der sporadischen Isolate. Für die Isolate mit identischem *spa*-Typ wurde nur exemplarisch für eines der Sequenztyp ermittelt. Rot markiert sind die Sequenztypen und Allelprofile der Isolate, die sich in mehr als zwei Allelen von den übrigen Sequenztypen des Clusters unterscheiden. In der rechten Spalte sind die BURP-Cluster der Staphtype-Software angegeben.

4. Diskussion

Staphylococcus aureus ist einer der häufigsten und wichtigsten Erreger invasiver, bakterieller Infektionen beim Menschen. Besonders als Erreger nosokomial erworbener Infektionen wie Pneumonien, Haut- und Wundinfektionen wird *S. aureus* sehr häufig identifiziert [22]. Ein großes infektionsepidemiologisches und hygienisches Problem stellt hierbei die in den letzten Jahren drastisch zunehmende Prävalenz Methicillin-resistenter *S. aureus*-Isolate dar. Infektionen durch diese häufig multiresistenten Keime sind schwierig zu therapieren und gehen mit einer im Vergleich zu Infektionen durch Methicillin-sensible Stämme erhöhten Mortalität einher [17]. Deshalb ist die Infektionsüberwachung, die in erster Line der Verhinderung nosokomialer Infektionen und der Kontrolle von Infektionsausbrüchen dient, bei Methicillin-resistenten *S. aureus* von großer Bedeutung. Entscheidend für eine effektive Infektionsüberwachung ist die schnelle und zuverlässige Erkennung von Ausbrüchen durch diese Erreger. Bei der hierfür notwendigen Unterscheidung zwischen tatsächlichen Ausbrüchen und zufälligen Häufungen von MRSA-Infektionen werden verschiedene Typisierungsverfahren zur Erkennung klonal verwandter Isolate genutzt [16, 25, 33, 38, 42, 78]. Unter diesen ist die Pulsfeldgelelektrophorese für die Routinediagnostik die Methode der Wahl, da sie ein hohes Diskriminierungspotential, eine innerhalb eines Labors gute Reproduzierbarkeit und einen hohen Anteil typisierbarer Isolate aufweist. Nachteilig sind jedoch ein hoher Zeit- und Arbeitsaufwand, hohe Kosten und eine schlechte Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Labore. Daher besteht ein großes Interesse an der Etablierung neuer Methoden, die diese Nachteile überwinden. Einen vielversprechenden Ansatz stellen hierbei sequenzbasierte Methoden wie die *spa*-Typisierung dar, welche sich durch eine schnelle und einfache Durchführung, eine gute Reproduzierbarkeit und die Möglichkeit eines unkomplizierten Austausches der Ergebnisse verschiedener Labore über das Internet auszeichnet. Um die Wertigkeit einer Typisierungsmethode für kurzzeitige epidemiologische Untersuchungen bzw. globale, populationsgenetische Studien einschätzen zu können, ist die Kenntnis der Stabilität des untersuchten genetischen Markers von großer Bedeutung. So kann bei kurzzeitigen Ausbruchsuntersuchungen eine geringere Stabilität toleriert werden, während für globale, populationsgenetische Fragestellungen eine hohe Stabilität essentiell ist. Diesbezüglich liegen für das *spa*-Gen als genetischer Marker bisher diskrepante Ergebnisse vor. So

zeigten Kahl et. al. in einer longitudinalen Studie an 142 *S. aureus*-Isolaten, die aus persistierenden Infektionen von 10 Patienten mit Cystischer Fibrose gewonnen wurden, unabhängige Mutationen im *spa*-Gen in 10% der untersuchten Isolate. Hieraus wurde ein durchschnittliches Auftreten eines genetischen Ereignisses in 70 Monaten berechnet [47]. Frenay et. al. dagegen wiesen *in-vitro* während wiederholter Passage von *S. aureus*-Isolaten auf Schafsblutagar über 10 Tage, sowie in *in-vivo* durch die Untersuchung von Isolaten eines CF-Patienten über einen Zeitraum von fünf Jahren einen stabilen *spa*-Typ nach [28].

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Stabilität des *spa*-Gens Folgeisolate von drei Patienten untersucht, bei denen über einen Zeitraum von mehreren Jahren wiederholt MRSA in Haut- und Schleimhautabstrichen sowie chronischen Wundinfektionen nachgewiesen wurden. Die Klonalität dieser Isolate wurde mittels Pulsfeldgelelektrophorese als Referenzmethode festgestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen bei allen drei Patienten einzelne Isolate mit geringfügig variierenden PFGE-Mustern. Diese Abweichungen lassen sich in allen Fällen auf maximal zwei unabhängige genetische Ereignisse zurückführen, so dass die Klonalität der Isolate jeweils eines Patienten gesichert ist. Die *spa*-Typisierung ermöglicht ebenfalls eine eindeutige Typisierung der 20 Isolate dieser Gruppe. Hierbei zeigen die Folgeisolate zweier Patienten (S.G. und I.A.) alle einen konstanten *spa*-Typ. Die ersten fünf Folgeisolate des dritten Patienten (U.M.) zeigen ebenfalls einen identischen *spa*-Typ, beim sechsten Folgeisolat jedoch tritt ein *spa*-Typ auf, dessen Sequenz sich durch die Deletion einer Base im 13. Repeat von jener der übrigen Isolate unterscheidet. Somit wurde bei den Isolaten der Patienten über Zeiträume von 32, 45 bzw. 48 Monaten nur eine Mutation innerhalb des *spa*-Gens nachgewiesen, was einer Mutationsrate von einem genetischen Ereignis in 125 Monaten entspricht. Im Vergleich zu den von Kahl et. al. erhobenen Daten zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine niedrigere Mutationsrate des *spa*-Gens innerhalb des untersuchten Kollektivs. Eine Erklärung für diesen Unterschied ist möglicherweise in den verschiedenen Nachweisorten der *S. aureus*-Isolate zu suchen. Diesbezüglich konnten Goerke et al. durch Untersuchungen von Folgeisolaten aus dem Respirationstrakt von CF-Patienten sowie von Kolonisationsisolaten gesunder Probanden mittels Pulsfeldgelelektrophorese ein häufigeres Auftreten von Mutationen in den respiratorischen Isolaten der chronisch infizierten CF-Patienten zeigen [31, 32]. Als Ursache hierfür wird

ein erhöhter Selektionsdruck im Respirationstrakt des CF-Patienten diskutiert, welcher durch die spezifische Immunantwort und antimikrobielle Chemotherapien ausgeübt wird. Innerhalb dieses feindlichen Milieus wird in der genetischen Diversifizierung der Bakterienpopulation ein möglicher Überlebensvorteil durch Selektionierung besser angepasster Subpopulationen gesehen. Im Gegensatz hierzu entsprechen Haut, Schleimhäute bzw. Wunden möglicherweise eher dem natürlichen Reservoir von *S. aureus* und haben aufgrund der hochgradigen Anpassung von *S. aureus* an diese Lebensbedingungen einen genetisch stabilisierenden Einfluss auf die Bakterienpopulation. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sowohl die meisten Variationen in den PFGE-Mustern als auch die einzige Mutation im *spa*-Gen bei den Isolaten des Patienten U.M. aufgetreten sind. Diese Isolate wurden aus einem chronisch infizierten Ulkus gewonnen, während es sich bei den Isolaten der Patienten S.G. und I.A. um Kolonisationskeime aus verschiedenen Haut- und Schleimhautabstrichen und anderen Materialien handelt (Nasen-, Rachen-, Bindehaut-, Analabstriche, Stuhl, Urin). Es finden sich somit bei den Isolaten aus einem entzündlich veränderten Gewebe häufiger genetische Ereignisse als bei den Haut-und Schleimhautisolaten. Auch diese Beobachtung lässt sich analog zu den Ergebnissen von Goerke et al. interpretieren [32].

Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der Pulsfeldgelelektrophorese und denen der *spa*-Typisierung stellt das *spa*-Gen in dieser Untersuchung von Langzeitfolgeisolaten als den stabileren Marker heraus. So finden sich insbesondere unter den PFGE-Mustern der Folgeisolate des Patienten U.M. mehrere Varianten. Im Vergleich zum Erstisolat finden sich drei abweichende Muster, im weiteren zeitlichen Verlauf tritt aber auch das Ursprungsmuster wieder auf. Die bei den Folgeisolaten aufgetretenen Veränderungen sind nicht typisch für Punktmutationen, die im Bereich der Schnittstellen des Restriktionsenzyms auftreten, sondern deuten auf stattgefundene Rekombinationsereignisse hin. Die PFGE-Muster der bei den Patienten I.A. und S.G. nachgewiesenen MRSA-Isolate weisen deutlich weniger Variationen auf. Die Isolate 1-6 des Patienten I.A. weisen ein identisches PFGE-Muster auf. Erst bei den ab September 2002 nachgewiesenen Isolaten tritt ein Muster auf, welches im Vergleich zum Ausgangsmuster zwei Bandenunterschiede aufweist. Da diese Veränderung scheinbar auf der Verschiebung der ursprünglich bei 290

Kb gelegenen Bande beruht, kommt auch in diesem Fall als Erklärung am ehesten ein Rekombinationsereignis in Betracht. Von besonderem Interesse waren die Typisierungsergebnisse des Patienten S.G., da dieser seit März 2002 unter Immunsuppression stand und dies aufgrund eines möglicherweise verminderten Selektionsdrucks einen stabilisierenden Einfluss auf die genetische Evolution der ihn besiedelnden Mikroorganismen haben könnte. Erwartungsgemäß zeigt sich hier nur eine geringe Variation des PFGE-Musters bei einem der Isolate.
Sowohl die Pulsfeldgelelektrophorese als auch die *spa*-Typisierung identifizieren somit die Isolate jeweils eines Patienten als eindeutig klonal. Die Tatsache, dass hierbei in der Pulsfeldgelelektrophorese insgesamt häufiger geringfügig variierende Typisierungsergebnisse auftreten als in der *spa*-Typisierung, deutet darauf hin, dass die *spa*-Typisierung den stabileren Marker darstellt. Diese Ergebnisse decken sich mit den von Tang et. al. erhobenen Daten. Diese zeigen für *S. aureus*-Isolate, die in epidemiologischem Zusammenhang stehen und einen identischen *spa*-Typ aufweisen, das Auftreten von bis zu sieben Bandenunterschieden im PFGE-Muster in einem Untersuchungszeitraum von zwei Jahren [89].

Strommenger et. al. konnten bereits in einer umfangreichen Typisierungsstudie eine ausgeprägte Konkordanz zwischen *spa*-Typisierung und Pulsfeldgelelektrophorese bei der Zuordnung von *S. aureus*-Isolaten zu klonalen Linien zeigen [88]. Weiter geht aus dieser und einigen weiteren Studien hervor, dass *spa*-Typisierung und Pulsfeldgelelektrophorese ein gleichwertiges Diskriminierungspotential aufweisen. Da für die in Hamburg endemischen Stämme diesbezüglich noch keine hinlänglichen Untersuchungen existieren, wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Typisierungsergebnisse von *spa*-Typisierung und Pulsfeldgelelektrophorese für insgesamt 139 Isolate der vier in Hamburg endemisch vorkommenden Klone miteinander verglichen. Hierbei sollte untersucht werden, ob mit der *spa*-Typisierung die gleichen klonalen Zusammenhänge zwischen den Isolaten gefunden werden wie mit der Pulsfeldgelelektrophorese. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die *spa*-Typisierung möglicherweise eine weitreichendere Subtypisierung innerhalb der durch die Pulsfeldgelelektrophorese ermittelten Klone im Sinne eines größeren Diskriminierungspotentials erlaubt. Dies wäre aufgrund der regional hohen

Prävalenz dieser vier endemischen Stämme für die Routinediagnostik von großer praktischer Bedeutung. Die Typisierungsergebnisse der in Hamburg endemischen Klone zeigen, dass Isolate, die durch die Pulsfeldgelelektrophorese einem Klon zugeordnet werden, bis auf wenige Ausnahmen innerhalb des Berliner-Epidemiestamms auch mit der *spa*-Typisierung als klonal erkannt werden. Darüber hinaus können mit der *spa*-Typisierung deutliche Übereinstimmungen der Repeatfolgen der Isolate des Hamburger mit denen des Barnimer Epidemiestamms aufgezeigt werden, was auf eine Verwandtschaft dieser Stämme hindeutet. Da diese potentielle Verwandtschaft durch den visuellen Vergleich der PFGE-Muster der Isolate nicht erkennbar ist, wurde zur Verifizierung des Ergebnisses der *spa*-Typisierung exemplarisch für ein Isolat des Hamburger Stammes der MLST-Sequenztyp bestimmt. Diese Untersuchung zeigt den Sequenztyp ST22, welcher bereits als charakteristischer Sequenztyp des Barnimer Epidemiestamms erkannt wurde. Somit identifiziert die *spa*-Typisierung den Hamburger Epidemiestamm als Subklon des Barnimer Epidemiestamms, während die Pulsfeldgelelektrophorese diesen Zusammenhang nicht aufzeigen konnte. Dieses Ergebnis deutet auf eine überlegene Sensitivität der *spa*-Typisierung bei der Darstellung von klonalen Zusammenhängen zwischen epidemiologisch nicht direkt in Beziehung stehenden Isolaten hin. Abgesehen hiervon zeigen die Typisierungsergebnisse der untersuchten Methoden jedoch bezüglich der Zuordnung der Isolate zu den vier endemischen Klonen eine hohe Konkordanz auf. Somit sind die von Strommenger et. al. erhobenen Daten auch auf die in Hamburg vorkommenden Stämme übertragbar.

Innerhalb der vier Hauptklone lassen sich durch die Pulsfeldgelelektrophorese wie durch die *spa*-Typisierung vergleichbare Anzahlen an Subtypen finden. Dieses Ergebnis deutet auf ein gleichwertiges Diskriminierungspotential beider Methoden hin. An dieser Stelle muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die visuelle Analyse der PFGE-Muster subjektiven Einflüssen unterworfen ist und somit bei der Auswahl der in die Studie aufgenommenen Isolate möglicherweise nicht alle PFGE-Subtypen entdeckt wurden und gleichzeitig einzelne Subtypen überrepräsentiert sein können.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten anhand von Untersuchungen verschiedener *S. aureus*-Stammsammlungen eine hohe Konkordanz bei der Clusterbildung durch *spa*-

Typisierung/BURP im Vergleich zu anderen Typisierungsmethoden wie MLST, PFGE, Multilocus Enzyme Electrophoresis und Whole-Genom-DNA-Microarray zeigen [50, 65, 66, 88]. So konnten z.B. Mellman *et al.* durch die Typisierung einer 400 Isolate umfassenden Stammsammlung eine Konkordanz von 95,3% zwischen *spa*-Typisierung/BURP und MLST zeigen. Im Rahmen dieser Studie wurden die optimalen Werte für die beiden benutzerdefinierten Parameter des BURP-Algorithmus ermittelt [66].

Analog zu diesen Studien sollte im dritten Teil der vorliegenden Arbeit anhand einer Stichprobe von 21 in Hamburg sporadisch vorkommender klinischer Isolate die Konkordanz der Clusterbildung von *spa*-Typisierung, Pulsfeldgelelektrophorese und MLST überprüft werden. Hierbei war von besonderem Interesse, ob Isolate mit eindeutig nicht verwandten PFGE-Bandenmustern oder MLST-Sequenztypen in der *spa*-Typisierung als verwandt oder identisch fehlklassifiziert würden. Die Ergebnisse der *spa*-Typisierung wurden zunächst manuell analysiert und so 5 Cluster von Isolaten mit Übereinstimmungen in ihren Repeatmustern gebildet. Diese Cluster wurden im Anschluss unter Verwendung der BURP-Funktion der StaphType Software analysiert. Hierbei wurden für die benutzerdefinierten Parameter der BURP-Funktion die gleichen Werte verwendet wie von Mellmann et al. beschrieben [66]. BURP-Cluster sowie manuelle Cluster wurden mit den Ergebnissen von MLST und PFGE verglichen.

Im Vergleich zwischen manuell und mittels BURP-Funktion generierten *spa*-Clustern zeigt sich, dass die BURP-Funktion aus jedem manuell erstellten Cluster mindestens einen *spa*-Typ aufgrund zu großer Unterschiede in der Repeatsequenz ausschließt und diese als Singletons klassifiziert. Erwartungsgemäß wurden keine weiteren, über die manuell erkannten Verwandtschaften hinausgehenden Cluster durch die BURP-Funktion ermittelt. Der Vergleich der BURP-Clusterbildung mit den Typisierungsergebnissen von Pulsfeldgelelektrophorese und MLST zeigte bei 16 von 21 Isolaten übereinstimmende Zuordnungen. Fünf Isolate wurden durch die BURP-Funktion abweichend von den Ergebnissen der Pulsfeldgelelektrophorese und des MLST eingeordnet. Diese Diskrepanzen beruhen in zwei Fällen auf der Zuordnung von eindeutig nicht verwandten Isolaten zu einem Cluster durch die BURP-Funktion (Isolate 1 und 2 aus Cluster 1). In den übrigen drei Fällen diskrepanter Zuordnungen wurden eindeutig klonale Isolate durch die BURP-Funktion als Singletons klassifiziert (Isolate 3, 13 und 29).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die *spa*-Typisierung in Verbindung mit der BURP-Funktion grundsätzlich klonale Beziehungen zwischen MRSA-Isolaten wiedergeben kann. Gleichzeitig wird aber auch deutlich, dass die Ableitung von Klonalität aus den Typisierungsergebnissen eines einzelnen genetischen Markers fehleranfällig ist.

Für die klinische Diagnostik in mutmaßlichen Ausbruchssituationen sollten Fehlklassifizierungen, wie sie bei der Untersuchung der sporadischen Isolate aufgetreten sind, von untergeordneter Bedeutung sein, da für die Akkumulation so deutlicher Unterschiede in den Repeatsequenzen aufgrund der hohen Stabilität des *spa*-Gens sehr lange Zeiträume benötigt werden sollten. Trotzdem ist es wichtig, sich der Tatsache bewusst zu sein, dass Typisierungsmethoden, welche wie die *spa*-Typisierung auf der Sequenzierung eines einzelnen genetischen Markers beruhen, immer mit dem Risiko behaftet sind, durch Rekombinationsereignisse beeinträchtigt zu werden. Robinson et al. haben bereits das Auftreten solcher Rekombinationsereignisse, die das *spa*-Gen betreffen, beschrieben [79].

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die *spa*-Typisierung in Bezug auf Stabilität und Diskriminierungspotential der Pulsfeldgelelektrophorese mindestens ebenbürtig ist. Zusammengenommen mit den Vorteilen der *spa*-Typisierung im Hinblick auf Zeitaufwand, Durchführbarkeit, Kostenaufwand und Ergebnistransfer zwischen verschiedenen Laboren stellt sich die *spa*-Typisierung als überlegene Methode für die Bakterientypisierung in der Infektionsüberwachung dar. Darüber hinaus bietet die *spa*-Typisierung in Kombination mit der BURP-Funktion die Möglichkeit Rückschlüsse auf die klonale Identität von MRSA-Stämmen zu schließen, was allein durch die Pulsfeldgelelektrophorese nur in begrenztem Umfang möglich ist.

5. Zusammenfassung

Die in den letzten Jahren drastisch zunehmende Prävalenz Methicillin-resistenter *S. aureus*-Isolate stellt ein großes infektionsepidemiologisches Problem dar. Infektionen durch diese häufig multiresistenten Erreger sind schwierig zu therapieren und gehen mit einer im Vergleich zu Infektionen mit Methicillin-sensiblen Stämmen erhöhten Mortalität einher. Deshalb kommt einer schnellen und zuverlässigen Identifizierung von Übertragungswegen durch geeignete Typisierungsmethoden eine große Bedeutung zu.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Wertigkeit der *spa*-Typisierung sowohl für die Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge in der Routinediagnostik als auch für phylogenetische Analysen untersucht.

Durch Typisierungen von Folgeisolaten dreier über Zeiträume von mehreren Jahren mit MRSA besiedelten Patienten konnte eine ausgeprägte Stabilität des *spa*-Gens gezeigt werden.

Anhand von Untersuchungen der vier am UKE am häufigsten vorkommenden MRSA-Klone wurde deutlich, dass die *spa*-Typisierung analog zur Pulsfeldgelelektrophorese eine Unterscheidung dieser vier Klone ermöglicht. Darüber hinaus wurde einer der mittels Pulsfeldgelelektrophorese definierten Klone (Hamburger Klon) durch die *spa*-Typisierung als Subklon des Barnimer Epidemiestamms identifiziert. Innerhalb der vier großen Klone wurden mit beiden Methoden vergleichbare Anzahlen an Subklonen gefunden, was für ein ähnlich großes Diskriminierungspotential beider Methoden spricht.

In Untersuchungen von im UKE sporadisch vorkommenden Stämmen konnte durch Vergleiche der Typisierungsergebnisse von *spa*-Typisierung, Pulsfeldgelelektrophorese und MLST gezeigt werden, dass unter Verwendung der *spa*-Typisierung Rückschlüsse auf klonale Beziehungen zwischen MRSA-Isolaten gezogen werden können. Hierbei wurde auch deutlich, dass eine Typisierungsmethode, die auf der Sequenzierung eines einzelnen genetischen Markers beruht, besonders bei phylogenetischen Untersuchungen dem Risiko von Fehlklassifikationen aufgrund von Rekombinationsereignissen unterliegt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die *spa*-Typisierung in Bezug auf Stabilität und Diskriminierungspotential der Pulsfeldgelelektrophorese mindestens ebenbürtig ist. Zusammengenommen mit den Vorteilen der *spa*-Typisierung im Hinblick auf Zeitaufwand, Durchführbarkeit, Kostenaufwand und Ergebnistransfer zwischen verschiedenen Laboren

stellt sich die *spa*-Typisierung als überlegene Methode für die Bakterientypisierung in der Infektionsüberwachung dar.

6. Literaturverzeichnis

1. Aanensen, D.M. and B.G. Spratt, *The multilocus sequence typing network: mlst.net.* Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W728-33.
2. Abbott, K.C. and L.Y. Agodoa, *Hospitalizations for bacterial endocarditis after initiation of chronic dialysis in the United States.* Nephron, 2002. **91**(2): p. 203-9.
3. Aires-de-Sousa, M., et al., *High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 619-21.
4. Archer, G.L. and E. Pennell, *Detection of methicillin resistance in staphylococci by using a DNA probe.* Antimicrob Agents Chemother, 1990. **34**(9): p. 1720-4.
5. Balaban, N. and A. Rasooly, *Staphylococcal enterotoxins.* Int J Food Microbiol, 2000. **61**(1): p. 1-10.
6. Bearman, G.M. and R.P. Wenzel, *Bacteremias: a leading cause of death.* Arch Med Res, 2005. **36**(6): p. 646-59.
7. Bierbaum, G., et al., *Presence of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin in Germany.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1999. **18**(10): p. 691-6.
8. Bone, R.C., *Gram-positive organisms and sepsis.* Arch Intern Med, 1994. **154**(1): p. 26-34.
9. Bougnoux, M.E., et al., *Multilocus sequence typing of Candida albicans: strategies, data exchange and applications.* Infect Genet Evol, 2004. **4**(3): p. 243-52.
10. Boyce, J.M., *Understanding and controlling methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections.* Infect Control Hosp Epidemiol, 2002. **23**(9): p. 485-7.
11. Bryant, R.E. and C.J. Salmon, *Pleural empyema.* Clin Infect Dis, 1996. **22**(5): p. 747-62; quiz 763-4.
12. Chambers, H.F., *Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications.* Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(4): p. 781-91.
13. Chambers, H.F., O.M. Korzeniowski, and M.A. Sande, *Staphylococcus aureus endocarditis: clinical manifestations in addicts and nonaddicts.* Medicine (Baltimore), 1983. **62**(3): p. 170-7.

14. Chang, S., et al., *Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene.* N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1342-7.

15. Chesney, P.J., et al., *Clinical manifestations of toxic shock syndrome.* Jama, 1981. **246**(7): p. 741-8.

16. Cookson, B.D., et al., *Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* J Med Microbiol, 1996. **44**(3): p. 179-84.

17. Cosgrove, S.E., et al., *Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia: a meta-analysis.* Clin Infect Dis, 2003. **36**(1): p. 53-9.

18. Diekema, D.J., et al., *Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999.* Clin Infect Dis, 2001. **32 Suppl 2**: p. S114-32.

19. Dinges, M.M., P.M. Orwin, and P.M. Schlievert, *Exotoxins of Staphylococcus aureus.* Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(1): p. 16-34, table of contents.

20. Dodgson, A.R., et al., *Multilocus sequence typing of Candida glabrata reveals geographically enriched clades.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(12): p. 5709-17.

21. Dufour, P., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin.* Clin Infect Dis, 2002. **35**(7): p. 819-24.

22. Emori, T.G. and R.P. Gaynes, *An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory.* Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(4): p. 428-42.

23. Enright, M.C., et al., *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 2000. **38**(3): p. 1008-15.

24. Enright, M.C., et al., *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7687-92.

25. Enright, M.C. and B.G. Spratt, *Multilocus sequence typing.* Trends Microbiol, 1999. **7**(12): p. 482-7.

26. Fang, G., et al., *Prosthetic valve endocarditis resulting from nosocomial bacteremia. A prospective, multicenter study.* Ann Intern Med, 1993. **119**(7 Pt 1): p. 560-7.

27. Faria, N.A., et al., *Epidemiology of emerging methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(4): p. 1836-42.

28. Frenay, H.M., et al., *Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus on the basis of protein A gene polymorphism.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996. **15**(1): p. 60-4.

29. Geipel, U. and M. Herrmann, *[Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Types of resistance and clinical consequences].* Anaesthesist, 2005. **54**(2): p. 155-62.

30. Ghuysen, J.M., *Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases.* Trends Microbiol, 1994. **2**(10): p. 372-80.

31. Goerke, C., et al., *High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing Staphylococcus aureus populations.* Environ Microbiol, 2007. **9**(12): p. 3134-42.

32. Goerke, C. and C. Wolz, *Regulatory and genomic plasticity of Staphylococcus aureus during persistent colonization and infection.* Int J Med Microbiol, 2004. **294**(2-3): p. 195-202.

33. Goh, S.H., et al., *Molecular typing of Staphylococcus aureus on the basis of coagulase gene polymorphisms.* J Clin Microbiol, 1992. **30**(7): p. 1642-5.

34. Gouello, J.P., et al., *Nosocomial endocarditis in the intensive care unit: an analysis of 22 cases.* Crit Care Med, 2000. **28**(2): p. 377-82.

35. Grundmann, H., *EARSS Annual Report 2005*. 2006, EARSS: Bilthoven.

36. Guss, B., et al., *Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A.* Eur J Biochem, 1984. **138**(2): p. 413-20.

37. Harmsen, D., et al., *Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(12): p. 5442-8.

38. Hartstein, A.I., et al., *Restriction enzyme analysis of plasmid DNA and bacteriophage typing of paired Staphylococcus aureus blood culture isolates.* J Clin Microbiol, 1989. **27**(8): p. 1874-9.

39. Hiramatsu, K., et al., *Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin.* Lancet, 1997. **350**(9092): p. 1670-3.

40. Hiramatsu, K., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility.* J Antimicrob Chemother, 1997. **40**(1): p. 135-6.

41. Hoban, D.J., et al., *Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000).* Diagn Microbiol Infect Dis, 2003. **45**(4): p. 279-85.

42. Hookey, J.V., J.F. Richardson, and B.D. Cookson, *Molecular typing of Staphylococcus aureus based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene.* J Clin Microbiol, 1998. **36**(4): p. 1083-9.

43. Ichiyama, S., et al., *Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 1991. **29**(12): p. 2690-5.

44. Ito, T. and K. Hiramatsu, *[Evolution and spread of SCCmec among staphylococci]*. Nippon Rinsho, 2007. **65 Suppl 2 Pt. 1**: p. 415-22.

45. Ito, T., K. Kuwahara, and K. Hiramatsu, *Staphylococcal cassette chromosome mec(SCC mec) analysis of MRSA.* Methods Mol Biol, 2007. **391**: p. 87-102.

46. Ito, T., et al., *Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(7): p. 2637-51.

47. Kahl, B.C., et al., *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, 2005. **43**(1): p. 502-5.

48. Kloos, W.E., *Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans.*, in *The staphylococci in human disease.*, K.B. Crossley, and G. L. Archer., Editor. 1997, Churchill Livingston: New York. p. 113 - 137.
49. Kloos, W.E. and T.L. Bannerman, *Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci.* Clin Microbiol Rev, 1994. **7**(1): p. 117-40.
50. Koreen, L., et al., *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, 2004. **42**(2): p. 792-9.
51. Ladhani, S., et al., *Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome.* Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(2): p. 224-42.
52. Lark, R.L., et al., *Four-year prospective evaluation of community-acquired bacteremia: epidemiology, microbiology, and patient outcome.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2001. **41**(1-2): p. 15-22.
53. Lina, G., et al., *Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia.* Clin Infect Dis, 1999. **29**(5): p. 1128-32.
54. Linde, H., et al., *Healthcare-associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leucocidin gene in southeastern Germany.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005. **24**(6): p. 419-22.
55. Lowy, F.D., *Staphylococcus aureus infections.* N Engl J Med, 1998. **339**(8): p. 520-32.
56. Lynch, J.P., 3rd, *Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment.* Chest, 2001. **119**(2 Suppl): p. 373S-384S.
57. Maiden, M.C., et al., *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3140-5.
58. Marrack, P. and J. Kappler, *The staphylococcal enterotoxins and their relatives.* Science, 1990. **248**(4956): p. 705-11.

59. Marshall, S.A., et al., *Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (mecA) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program.* Diagn Microbiol Infect Dis, 1998. **30**(3): p. 205-14.

60. McCormick, J.K., J.M. Yarwood, and P.M. Schlievert, *Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update.* Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 77-104.

61. McDougal, L.K., et al., *Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the United States: establishing a national database.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(11): p. 5113-20.

62. McDougal, L.K. and C. Thornsberry, *The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins.* J Clin Microbiol, 1986. **23**(5): p. 832-9.

63. Mellmann, A., et al., *[Evidence-based infection control methods using spa genotyping for MRSA spread in hospitals]*. Dtsch Med Wochenschr, 2005. **130**(22): p. 1364-8.

64. Mellmann, A., et al., *Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus outbreaks.* PLoS Med, 2006. **3**(3): p. e33.

65. Mellmann, A., et al., *Characterization of the Clonal Relatedness among the Natural Population of Staphylococcus aureus Using spa Sequence Typing and the BURP Algorithm.* J Clin Microbiol, 2008.

66. Mellmann, A., et al., *Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of Staphylococcus aureus populations based on spa polymorphisms.* BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 98.

67. Moreillon, P., *Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock)*, in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, G.L. Mandell, Editor. 2004, Churchill Livingstone. p. 2321 - 2349.

68. Morin, C.A. and J.L. Hadler, *Population-based incidence and characteristics of community-onset Staphylococcus aureus infections with bacteremia in 4 metropolitan Connecticut areas, 1998.* J Infect Dis, 2001. **184**(8): p. 1029-34.

69. Mulvey, M.R., et al., *Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant Staphylococcus aureus using pulsed-field gel electrophoresis.* J Clin Microbiol, 2001. **39**(10): p. 3481-5.

70. Murchan, S., et al., *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, 2003. **41**(4): p. 1574-85.

71. Nubel, U., et al., *Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(37): p. 14130-5.

72. Olive, D.M. and P. Bean, *Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms.* J Clin Microbiol, 1999. **37**(6): p. 1661-9.

73. Osiyemi, O. and G. Dickinson, *Gram-Positive Pneumonia.* Curr Infect Dis Rep, 2000. **2**(3): p. 207-214.

74. Ploy, M.C., et al., *First clinical isolate of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in a French hospital.* Lancet, 1998. **351**(9110): p. 1212.

75. Prevost, G., et al., *Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an intensive care unit.* J Hosp Infect, 1991. **17**(4): p. 255-69.

76. Reed, K.D., M.E. Stemper, and S.K. Shukla, *Pulsed-field gel electrophoresis of MRSA.* Methods Mol Biol, 2007. **391**: p. 59-69.

77. Reiss, M.A., *Toxic shock syndrome.* Prim Care Update Ob Gyns, 2000. **7**(3): p. 85-90.

78. Richardson, J.F., et al., *Ribotyping of Staphylococcus aureus: an assessment using well-defined strains.* Epidemiol Infect, 1994. **112**(1): p. 93-101.

79. Robinson, D.A. and M.C. Enright, *Evolution of Staphylococcus aureus by large chromosomal replacements.* J Bacteriol, 2004. **186**(4): p. 1060-4.

80. Robinson, D.A. and M.C. Enright, *Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(12): p. 3926-34.

81. Ruppitsch, W., et al., *Classifying spa types in complexes improves interpretation of typing results for methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(7): p. 2442-8.

82. Shopsin, B., et al., *Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of Staphylococcus aureus strains.* J Clin Microbiol, 1999. **37**(11): p. 3556-63.

83. Sieradzki, K., et al., *The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection.* N Engl J Med, 1999. **340**(7): p. 517-23.

84. Sperber, W.H. and S.R. Tatini, *Interpretation of the tube coagulase test for identification of Staphylococcus aureus.* Appl Microbiol, 1975. **29**(4): p. 502-5.

85. Spratt, B.G., *Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet.* Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(3): p. 312-6.

86. Srinivasan, A., J.D. Dick, and T.M. Perl, *Vancomycin resistance in staphylococci.* Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(3): p. 430-8.

87. Strommenger, B., et al., *spa Typing of Staphylococcus aureus as a frontline tool in epidemiological typing.* J Clin Microbiol, 2008. **46**(2): p. 574-81.

88. Strommenger, B., et al., *Assignment of Staphylococcus isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(7): p. 2533-40.

89. Tang, Y.W., et al., *Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 2000. **38**(4): p. 1347-51.

90. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, and R.V. Goering, *How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America.* Infect Control Hosp Epidemiol, 1997. **18**(6): p. 426-39.

91. Tenover, F.C., et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.* J Clin Microbiol, 1995. **33**(9): p. 2233-9.

92. Tenover, F.C. and L.C. McDonald, *Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control.* Curr Opin Infect Dis, 2005. **18**(4): p. 300-5.

93. Uhlen, M., et al., *Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications.* J Biol Chem, 1984. **259**(3): p. 1695-702.

94. Urwin, R. and M.C. Maiden, *Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology.* Trends Microbiol, 2003. **11**(10): p. 479-87.

95. van Belkum, A., et al., *Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology.* Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(3): p. 547-60.

96. van Belkum, A., et al., *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, 1998. **36**(6): p. 1653-9.

97. von Heijne, G. and M. Uhlen, *Homology to region X from staphylococcal protein A is not unique to cell surface proteins.* J Theor Biol, 1987. **127**(3): p. 373-6.

98. Weber, S., M.A. Pfaller, and L.A. Herwaldt, *Role of molecular epidemiology in infection control.* Infect Dis Clin North Am, 1997. **11**(2): p. 257-78.

99. Weinstein, M.P., et al., *The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults.* Clin Infect Dis, 1997. **24**(4): p. 584-602.

100. Wichelhaus, T.A., S. Schäfer, and V. Brade, *Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie.* Chemotherapie Jounal, 2000. **9**(2).

7. Anhang

7.1 Tabellarische Übersicht über die untersuchten Isolate

Nr.	Patienten-initialen	Geburtsdatum	Isolationsdatum	PFGE-Muster	*spa*-Typ
1.	U.M.	09.09.1952	Dezember 00	E1	t009
2.	U.M.	09.09.1952	Januar 03	E2	t009
3.	U.M.	09.09.1952	Mai 03	E1	t009
4.	U.M.	09.09.1952	Dezember 03	E3	t009
5.	U.M.	09.09.1952	Mai 04	E1	t009
6.	U.M.	09.09.1952	September 04	E4	tx
7.	I.A.	30.01.1996	Januar 00	F1	t037
8.	I.A.	30.01.1996	Januar 01	F1	t037
9.	I.A.	30.01.1996	August 01	F1	t037
10.	I.A.	30.01.1996	November 01	F1	t037
11.	I.A.	30.01.1996	Januar 02	F1	t037
12.	I.A.	30.01.1996	April 02	F1	t037
13.	I.A.	30.01.1996	September 02	F2	t037
14.	I.A.	30.01.1996	Januar 04	F2	t037
15.	S.G.	08.01.1989	Januar 02	G1	t030
16.	S.G.	08.01.1989	März 02	G1	t030
17.	S.G.	08.01.1989	Juli 02	G1	t030
18.	S.G.	08.01.1989	Juni 04	G1	t030
19.	S.G.	08.01.1989	August 04	G1	t030
20.	S.G.	08.01.1989	September 04	G2	t030
21.	R.S.	22.01.1952	März 00	A1	t032
22.	A.G.	23.03.1930	Juni 00	A1	t032
23.	F.E.	15.09.1923	Juli 00	A1	t032
24.	M.H.	16.06.1929	Oktober 00	A1	t032
25.	L.D.	22.11.1969	Oktober 00	A1	t032
26.	S.B.	18.02.1948	Dezember 00	A1	t032
27.	H.H.	06.09.1938	Februar 00	A1	t032
28.	J.E.	10.11.1922	März 00	A1	t032
29.	H.D.	01.06.1964	Juni 00	A1	t032
30.	K.W.	27.07.1915	September 00	A1	t032
31.	E.S.	30.01.2000	Oktober 00	A1	t032
32.	W.W.	12.03.1929	Dezember 00	A1	t032
33.	Z.S.	01.07.1946	Februar 01	A1	t032
34.	L.A.	08.05.1967	Mai 01	A1	t032
35.	D.R.	24.03.1935	Juni 01	A1	t032
36.	U.K.	30.04.1968	August 01	A1	t032
37.	G.J.	22.05.1940	September 01	A1	t032

38.	H.H.	20.04.1936	November 01	A1	t032
39.	R.O.	07.06.1933	Januar 01	A3	t032
40.	G.G.	11.08.1961	Mai 01	A1	t032
41.	S.W.	03.12.1927	August 01	A1	t032
42.	H.C.	19.04.1902	September 01	A1	t032
43.	K.A.	18.12.1921	November 01	A1	t032
44.	B.L.	03.01.1924	Januar 02	A1	t032
45.	G.U.	26.09.1936	März 02	A1	t032
46.	H.D.	29.05.1947	Mai 02	A2	t032
47.	R.K.	05.09.1944	August 02	A1	t032
48.	B.R.	01.09.1944	September 02	A1	t032
49.	W.J.	08.05.1930	November 02	A1	t032
50.	R.O.	07.06.1933	Januar 02	A1	t032
51.	E.K.	12.01.1933	Mai 02	A3	t032
52.	P.M.	07.12.1934	Dezember 02	A3	t032
53.	N.M.	17.07.1940	Januar 03	A1	t032
54.	J.W.	19.11.1918	März 03	A2	t032
55.	L.H.	28.06.1932	Mai 03	A1	t032
56.	F.I.	21.01.1911	Juli 03	A1	t032
57.	S.R.	16.06.1948	September 03	A1	t032
58.	N.A.	26.04.1983	November 03	A2	t032
59.	H.W.	26.10.1939	Januar 03	A1	t032
60.	F.E.	17.06.1929	März 03	A1	t032
61.	K.H.	09.05.1929	Mai 03	A1	t032
62.	T.H.	05.02.1926	Juli 03	A1	t032
63.	S.E.	30.11.1899	September 03	A1	t032
64.	S.H.	25.01.1921	November 03	A1	t032
65.	B.U.	28.11.1927	Januar 04	A1	t032
66.	W.K.	10.02.1928	März 04	A1	t032
67.	B.H.	16.02.1914	Mai 04	A1	t032
68.	W.L.	03.08.1918	Juli 04	A1	t032
69.	S.H.	23.02.1941	September 04	A1	t022
70.	R.T.	23.01.1954	Dezember 04	A2	t032
71.	B.I.	13.09.1924	Januar 04	A1	t032
72.	M.H.	09.02.1938	März 04	A1	t032
73.	S.B.	29.05.1962	Mai 04	A1	t032
74.	S.W.	12.01.1938	Juli 04	A1	t032
75.	K.I.	27.10.1923	September 04	A1	t032
76.	M.K.	16.02.1940	Dezember 04	A1	t032
77.	W.T.	27.11.1956	März 00	B1	t004
78.	S.H.	03.05.1937	April 00	B1	t004
79.	M.G.	23.05.2000	Mai 00	B1	t004

80.	N.W.	12.04.1940	Juni 00	B1	t004
81.	B.M.	09.02.1935	August 00	B2	t550
82.	H.E.	20.07.1927	Januar 00	B1	t004
83.	R.W.	29.10.1938	März 00	B1	t004
84.	K.H.	23.07.1905	Oktober 00	B1	t004
85.	F.G.	15.08.1944	Oktober 00	B1	t004
86.	W.B.	15.08.1973	Oktober 00	B1	t004
87.	K.W.	19.08.1924	März 01	B1	t004
88.	S.S.	22.01.1975	Juni 01	B1	t004
89.	S.M.	06.10.1921	August 01	B1	t004
90.	P.A.	23.02.1962	Oktober 01	B1	t004
91.	S.B.	18.02.1948	Februar 01	B3	t004
92.	B.E.	17.10.1929	März 01	B1	t004
93.	S.W.	03.12.1927	April 01	B3	t362
94.	R.M.	19.09.1983	August 01	B1	t004
95.	S.P.	29.01.1934	Oktober 01	B1	t004
96.	T.G.	26.08.1934	November 01	B1	t004
97.	K.W.	20.09.1931	Dezember 01	B1	t004
98.	M.K.	14.01.1953	Februar 02	B1	t004
99.	H.K.	15.04.1926	März 02	B1	t004
100.	L.R.	10.08.1949	April 02	B1	t004
101.	B.F.	27.09.1911	Mai 02	B1	t004
102.	E.F.	16.09.1931	Dezember 02	B1	t004
103.	K.W.	20.09.1931	Januar 02	B1	t004
104.	K.G.	27.06.1922	März 02	B1	t533
105.	R.I.	05.11.1951	Oktober 02	B4	t004
106.	T.A.	20.02.1981	Januar 03	B1	t004
107.	O.S.	02.07.1927	März 03	B1	t004
108.	S.W.	08.11.1959	April 03	B5	t004
109.	B.M.	21.01.1958	Mai 03	B1	t266
110.	L.P.	30.10.1960	Oktober 03	B5	t015
111.	W.A.	05.08.1941	Dezember 03	B1	t065
112.	B.A.	12.08.1910	Januar 03	B4	t004
113.	M.H.	04.02.1938	März 03	B6	t1238
114.	M.H.	04.02.1938	Mai 03	B7	t1238
115.	S.U.	02.04.1959	Juli 03	B4	t004
116.	Z.C.	24.01.1980	August 03	B1	t004
117.	H.F.	17.03.1927	Oktober 03	B1	t004
118.	N.B.	04.03.1948	Dezember 03	B1	t004
119.	M.J.	19.06.1939	Februar 04	B1	t004
120.	W.S.	08.05.1935	März 04	B1	t004
121.	S.H.	18.02.1925	Mai 04	B1	t004

122.	B.B.	07.01.1961	Juli 04	B1	t004
123.	S.H.	18.12.1948	Dezember 04	B1	t004
124.	H.F.	17.03.1927	Januar 04	B1	t004
125.	W.H.	13.02.1927	Februar 04	B1	t004
126.	S.H.	06.05.1936	Mai 04	B1	t004
127.	T.R.	24.08.1944	Juli 04	B1	t004
128.	M.K.	05.08.1932	Mai 03	C2	t431
129.	O.L.	23.12.1920	Mai 03	C1	t431
130.	M.C.	24.08.1925	Mai 03	C1	t431
131.	T.W.	15.10.1930	Juni 03	C1	t431
132.	S.E.	21.04.1917	Juni 03	C1	t431
133.	H.K.	08.06.1909	Juli 03	C1	t431
134.	B.K.	16.11.1933	September 03	C1	t431
135.	C.A.	03.12.1970	September 03	C1	t431
136.	K.G.	06.03.1921	Oktober 03	C1	t431
137.	K.L.	25.10.1917	November 03	C1	t431
138.	K.H.	17.04.1932	April 04	C1	t431
139.	G.H.	04.05.1948	April 04	C1	t1437
140.	S.H.	19.03.1929	Juli 04	C2	t431
141.	F.E.	25.07.1920	September 04	C1	t1436
142.	R.H.	12.06.1935	Oktober 04	C2	t431
143.	K.I.	21.01.1927	Oktober 04	C1	t431
144.	B.O.	25.08.1911	November 04	C2	t431
145.	T.D.	25.08.1926	November 04	C2	t431
146.	G.M.	11.03.1935	Dezember 04	C1	t431
147.	P.E.	18.11.1927	Februar 02	D1	t018
148.	B.N.	21.09.2002	Oktober 02	D1	t018
149.	L.G.	11.10.1916	Mai 03	D2	t021
150.	T.A.	13.04.1977	März 04	D3	t018
151.	O.A.	10.04.1921	Mai 04	D4	t1239
152.	N.F.	29.05.1947	Oktober 04	D5	t018
153.	S.M.	06.07.1975	November 04	D1	t018
154.	K.U.	23.09.1922	Dezember 04	D1	t021
155.	A.S.	01.01.1964	April 05	D1	t018
156.	S.M.	06.07.1975	Januar 05	D1	t018
157.	K.S.	14.06.1957	Januar 05	D5	t018
158.	K.H.	13.10.1919	August 05	D1	t021
159.	P.H.	19.01.1933	Januar 00	E5	t051
160.	B.G.	08.10.1929	September 00	D6	t1483
161.	Z.M.	18.08.1951	März 00	E6	t009
162.	C.J.	01.06.1946	Juli 00	I1	t044
163.	R.S.	05.05.1991	November 00	J1	t435

164.	S.A.	05.07.1931	April 01	E7	t008
165.	J.A.	30.09.1949	August 01	K1	t084
166.	H.R.	11.08.1914	August 01	L1	t127
167.	J.I.	30.05.1937	Januar 02	N1	t305
168.	T.L.	04.09.1926	Oktober 02	A3	t432
169.	A.S.	01.07.1956	Oktober 02	F3	t037
170.	G.A.	26.02.1939	März 03	I2	t044
171.	V.I.	20.08.1926	Mai 03	A1	t032
172.	V.W.	07.09.1919	September 03	H1	t110
173.	A.O.	01.01.1945	September 03	F4	t037
174.	H.P.	04.12.1934	Oktober 03	H1	t110
175.	K.G.	21.08.2001	Oktober 03	M1	t186
176.	A.F.	19.12.1960	November 04	F5	t037
177.	A.V.	16.09.1990	Oktober 04	G1	t030
178.	S.P.	11.12.1959	März 05	H1	t041
179.	H.H.	19.08.1939	Januar 05	B8	t004
180.	G.D.	18.04.1970	Januar 05	E8	t008
181.	H.K.	23.10.1934	Januar 05	E9	t008
182.	E.C.	03.04.1974	Februar 05	C2	t431

7.2 Tabellarische Übersicht über die gefundenen *spa*-Typen

***spa*-Typ**	**Repeatsequenz**
t004	09-02-16-13-13-17-34-16-34
t008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
t009	11-12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-25
t015	08-16-02-16-34-13-17-34-16-34
t018	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24-24
t021	15-12-16-02-16-02-25-17-24
t022	26-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
t030	15-12-16-02-24-24
t032	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
t037	15-12-16-02-25-17-24
t041	26-30-17-34-17-20-17-34-17-20-17-12-17-16
t044	07-23-12-34-34-33-34
t051	11-19-21-12-21-17-34-24-34-22-25
t065	09-02-16-34-13-17-34-16-34
t084	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
t110	26-30-17-12-17-16
t127	07-23-21-16-34-33-13
t186	07-12-21-17-13-13-34-34-33-34
t266	09-02-16-13-13-13-17-34-16-34

t305	11-12-21-17-34-24-34-24-34-22-25
t362	09-34
t431	26-23-31-29-17-25-17-25-25-16-28
t432	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16
t435	14-44-13-17-17-17-23-18-17
t533	09-16-13-13-17-34-16-34
t550	08-17-34-16-34
t1238	08-104-02-16-34-13-17-34-16-34
t1239	15-12-16-02-16-02-24-24-24
t1436	26-31-29-17-25-17-25-25-16-28
t1437	26-23-31-29-17-25-16-28
t1483	123-12-02-16-02-25-17-24-24-24-24

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MRSA-Prävalenz in Europa (Anzahl MRSA / Gesamtzahl isolierter *S. aureus*) nach Grundmann et al. (EARSS Annual Report 2005) [32] 4
Abbildung 2: Genetische Organisation des *S. aureus* Protein A-Gens (*spa*) modifiziert nach Shopsin et al. [79]..... 11
Abbildung 3: PFGE-Muster der bei Patient U.M. im Zeitraum von Dezember 2000 bis September 2004 nachgewiesenen Isolate..... 29
Abbildung 4: PFGE-Muster der bei Patient I.A. im Zeitraum von Januar 2000 bis Januar 2004 nachgewiesenen Isolate.. 30
Abbildung 5: PFGE-Muster der bei Patient S.G. im Zeitraum von Januar 2002 bis September 2004 nachgewiesenen Isolate. 31
Abbildung 6: Repräsentative PFGE-Muster der Barnimer Subtypen (A1 bis A3). 33
Abbildung 7: Repräsentative PFGE-Muster der Berliner Subtypen (B1 – B7). 34
Abbildung 8: Repräsentative PFGE-Muster der Hamburger Subtypen (C1 und C2).. 35
Abbildung 9: Repräsentative PFGE-Muster der EMRSA-16 Subtypen (D1 bis D5). 36
Abbildung 10: Innerhalb des Barnimer Klons gefundene *spa*-Typen. 38
Abbildung 11: Innerhalb des Berliner Klons ermittelte *spa*-Typen. 40
Abbildung 12: Innerhalb des Hamburger Klons ermittelte *spa*-Typen. 41
Abbildung 13: Vergleich des für den Barnimer Epidemiestamm typischen spa-Typ t032 mit dem spa-Typ t431 des „Hamburger“ Klons. 42
Abbildung 14: Innerhalb des EMRSA-16 Klons ermittelte *spa*-Typen. 42

Abbildung 15: A: Ergebnisse der *spa*-Typisierung. B: PFGE-Muster von 12 sporadischen Isolaten..... 46
Abbildung 16: A: Ergebnisse der *spa*-Typisierung. B: PFGE-Muster von 9 sporadischen Isolaten..... 47
Abbildung 17: MLST, Übersicht über die Sequenztypen und Allelprofile der sporadischen Isolate..... 51

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Effekte genetischer Ereignisse auf PFGE-Muster (nach Tenover) 8
Tabelle 2: Kriterien für die Interpretation von PFGE-Mustern (nach Tenover) 10
Tabelle 3: "Housekeeping Genes" des MLST-Schemas für die Typisierung von *S. aureus* 14
Tabelle 4: Übersicht über verwendete Geräte 17
Tabelle 5: Übersicht über verwendete Chemikalien..... 17
Tabelle 6: Übersicht über verwendete Reagenzien und Enzyme 18
Tabelle 7: Übersicht über verwendete Primer 19
Tabelle 8: Übersicht über *spa*-Typen und Repeat-Sequenzen der Langzeitverläufe 32
Tabelle 9: Verteilung der *spa*-Typen und PFGE-Muster im Barnimer Klon 37
Tabelle 10: Verteilung der *spa*-Typen und PFGE-Muster im Berliner Klon 39
Tabelle 11: Verteilung der *spa*-Typen und PFGE-Muster im "Hamburger" Klon..... 41
Tabelle 12: Verteilung der *spa*-Typen und PFGE-Muster im EMRSA-16 Klon 43

8. Abkürzungen

bid.	bidestillata
BURP	based upon repeat pattern
BORSA	Borderline-resistenter *S. aureus*
C	Celsius
CF	Zystische Fibrose
cm	Zentimeter
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
g	Gramm
GISA	Glykopeptid-intermediate resistant *S. aureus*
h	Stunde
kB	Kilobasen
konz.	Konzentriert
kD	Kilodalton
L	Liter
LMP	Low melting point
M	Mol
m	Meter
MHK	Minimale Hemmkonzentration
µ	Mikro
min.	Minute
MLST	Multilocus sequence typing
MRSA	Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*
NCTC	National Collection of Type Cultures
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance System
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBP	Penicillin-bindendes Protein

PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PVL	Panton-Valentine Leukocidine
RFLP	Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus
rpm	Rotation per minute
s	Sekunde
SCC	Staphylococcus Cassette Chromosome
SSSS	Staphylococcus scalded skin syndrome
spa	*Staphylococcus aureus*-Protein A
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Bor EDTA
TE	Tris EDTA
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
TSS	Toxic Shock Syndrome
TSST	Toxic Shock Syndrome-Toxin
U	Unit
U.S.A.	United States of America
UV	Ultraviolett
V	Volt
VISA	Vancomycin-intermediate resistant *S. aureus*

9. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte bedanken.

Herrn Prof. Dr. M. Kaulfers danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. J. K.-M. Knobloch. Seine wissenschaftliche Betreuung habe ich als sehr motivierend und hilfreich empfunden.

Frau Dr. S. Scherpe sowie dem Laborpersonal aus der Krankenhaushygiene danke ich für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich mich auch bei den Doktoranden Sandra Schewe, Philip Pehle, Kim Wegert, Chia-Jung Wang und Ulrike Wendt, die mich trotz räumlicher Trennung herzlich aufgenommen haben, bedanken.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten	Manuel Wolters, geb. am 08.07.1980 in Reinbek, ledig
Schulbildung	
1987 - 1991	Grundschule Reinbek
1991-2000	Gymnasium Glinde
2000	Abitur
Zivildienst	
2000-2001	Zivildienst Integrationskindergarten Glinde
Hochschulstudium	
2001-2008	Humanmedizin an der Universität Hamburg
2003	Ärztliche Vorprüfung
2006	Wahlfach Mikrobiologie
07/2008	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt
Famulaturen	
09/ 2004	Viszeralchirurgie des Universitätsspitals Zürich
04/2005	Institut für Rechtsmedizin des UKE
07/2005	Medizinischen Notaufnahme des UKE
11/ 2006	Zentrum für Innere Medizin am Marienkrankenhaus (Schwerpunkt Infektiologie)
Praktisches Jahr	
2007	1. Innere Medizin UKE 2. Chirurgie Asklepios Klinik St. Georg 3. Mikrobiologie UKE
Ärztliche Weiterbildung	
Seit 07/2008	Seit 07/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Eppendorf

Publikation: M. Hentschke, B. Saager, M. A. Horstkotte, S. Scherpe, M. Wolters, H. Kabisch, R. Grosse, P. Heisig, M. Aepfelbacher and H. Rohde. *Emergence of Linezolid Resistance in a Methicillin Resistant Staphylococcus aureus.* Infection, 2008. 36(1):85-7