

Aus dem Institut für Mikrobiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Untersuchungen zu *agr*-Genotypen, Biofilmbildung und SCC*mec*-Typen von
klinischen *Staphylococcus epidermidis*-Isolaten am Universitätsklinikum Magdeburg

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von

Anke Martina Mertens

aus

Magdeburg

Magdeburg

2013

Meinen Eltern

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Mertens, Anke Martina:

Untersuchungen zu *agr*-Genotypen, Biofilmbildung und SCC*mec*-Typen von klinischen *Staphylococcus epidermidis*-Isolaten am Universitätsklinikum Magdeburg.-2013-93 Bl.: 23 Abb., 17 Tab., 3 Anl.

Kurzreferat

S. epidermidis galt lange Zeit als nicht-pathogener Besiedler der menschlichen Haut. Inzwischen wird diesem Bakterium durchaus eine humanpathogene Bedeutung zugewiesen, wobei die Biofilmbildung als wichtigster Pathogenitätsfaktor gilt. Voraussetzung für die Biofilmbildung ist das Vorhandensein des *ica*-Operons, wobei jedoch nur rund die Hälfte der Isolate mit einem *ica*-Operon auch tatsächlich einen Biofilm bildet. Das Insertionselement IS256 kann als Indikator für die Virulenz eines *S. epidermidis*-Isolates fungieren. Des Weiteren vermittelt es wahrscheinlich die intermittierende Inaktivierung des *ica*-Operons. Das Resistenzverhalten hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die Pathogenität von *S. epidermidis* und wird u.a. vom SCC*mec*-Komplex vermittelt. Es werden verschiedene SCC*mec*-Typen unterschieden, wobei möglicherweise eine Assoziation zwischen dem SCC*mec*-Typ und dem Auftreten von Multiresistenz vorliegt. Das *agr*-System reguliert Gene wachstumsabhängig und ist ein Regulator von Virulenzfaktoren. Es können drei verschiedene *agr*-Gruppen unterschieden werden, wobei auch hier eine Assoziation zwischen der *agr*-Gruppe und dem Resistenzverhalten der Isolate zu bestehen scheint. Das Untersuchungsmaterial wurde zur besseren Vergleichbarkeit in Gruppen geordnet. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Zuordnung zum SCC*mec*-Typ bzw. der *agr*-Gruppe und dem Untersuchungsmaterial festgestellt werden. Mittels Multisequenzanalyse wurden einige der *S. epidermidis*-Isolate einer klonalen Linie bzw. einem Sequenztyp zugeordnet. Auf dieser Basis konnte Aussage zur Verwandtschaft verschiedener *S. epidermidis*-Klone gemacht werden. Am Universitätsklinikum der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg gibt es eine Dominanz von Sequenztypen (ST2, ST5, ST10 und ST242), die überdies vergleichsweise eng miteinander verwandt sind.

Schlüsselwörter

S. epidermidis, Biofilm, *agr*, SCC*mec*, IS256, Sequenzierung, *ica*

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
1.2	Biofilmbildung	2
1.2.1	Die initiale Adhärenz	2
1.2.2	Die Akkumulationsphase.....	3
1.2.3	Die Phase der Ablösung.....	3
1.3	Das <i>intercellular adhesin-(ica)</i> Operon	5
1.4	Das Insertionselement IS256.....	6
1.5	Das <i>accessory gene regulator-(agr)</i> System	6
1.5.1	Pheromone	7
1.5.2	Targets der <i>agr</i> -Regulation.....	7
1.6	Der staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> -(SCC <i>mec</i>) Komplex	8
1.7	Analyse des Sequenztyps.....	9
1.8	Aufgabenstellung dieser Arbeit	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Geräte.....	11
2.2	Plastikmaterialien und Zubehör.....	12
2.3	Chemikalien, Enzyme, Reagenzien, Puffer, Lösungen und Kits	12
2.3.1	Enzyme und Reagenzien	12
2.3.2	Chemikalien und Lösungen.....	13
2.3.3	Käuflich erworbene Kits.....	13
2.3.4	Puffer und Lösungen.....	13
2.3.5	Käuflich erworbene Fertigpuffer, Fertiglösungen und Fertigmedien.....	13
2.4	Nährböden und Bakterienstämme.....	14
2.4.1	Nährböden	14
2.4.2	<i>S. epidermidis</i> -Isolate.....	14
2.5	Phänotypische Methoden.....	15
2.5.1	Kultivierung von <i>S. epidermidis</i> auf Columbia-Blutagar	15
2.5.2	Kultivierung von <i>S. epidermidis</i> auf Kongorot-Agar	15
2.5.3	Phänotypische Untersuchung von <i>S. epidermidis</i>	15
2.6	Genotypische Methoden	16
2.6.1	DNA-Isolierung von <i>S. epidermidis</i>	16
2.6.2	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	16

2.6.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	17
2.6.4	Herstellung des Agarosegels.....	17
2.6.5	<i>agr</i> -Typisierung von <i>S. epidermidis</i>	17
2.6.6	Untersuchung auf IS256.....	18
2.6.7	Untersuchung auf den <i>ica</i> -Genkomplex.....	19
2.6.8	Untersuchung auf das Vorhandensein des <i>SCCmec</i> -Komplexes	19
2.6.9	Multilocus-Sequenzanalyse (MLST)	21
2.6.9.1	Aufreinigung der PCR-Produkte	23
2.6.9.2	DNA-Sequenzierung	23
2.6.9.3	Auswertung der klonalen Linien von <i>S. epidermidis</i> (MLST).....	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Auswahl der Isolate.....	25
3.2	Antibiotikaresistenz der <i>S. epidermidis</i> -Isolate	26
3.3	Nachweis der Biofilmbildung	27
3.4	Genotypische Untersuchungen	28
3.4.1	Nachweis der <i>ica</i> -Gene	28
3.4.2	Das Insertionselement IS256	30
3.4.3	<i>agr</i> -Gruppenspezifität.....	32
3.4.4	<i>SCCmec</i> -Typisierung	33
3.4.5	<i>SCCmec</i> -Typen im Zusammenhang mit der Antibiotikaresistenz	34
3.4.6	Korrelation zwischen den <i>agr</i> -Gruppen und den <i>SCCmec</i> -Typen.....	35
3.4.7	<i>agr</i> -Gruppenspezifität bei multiresistenten <i>S. epidermidis</i> -Isolaten.....	36
3.4.8	<i>SCCmec</i> -Typen bei multiresistenten <i>S. epidermidis</i> -Isolaten	37
3.4.9	Korrelation zwischen der <i>agr</i> -Gruppenspezifität und dem <i>SCCmec</i> -Typ bei multiresistenten <i>S. epidermidis</i> -Isolaten	37
3.4.10	<i>SCCmec</i> -Typen und <i>agr</i> -Gruppen in Abhängigkeit vom klinischen Material ..	38
3.5	Sequenzierung einzelner <i>S. epidermidis</i> -Isolate.....	39
3.5.1	Vorkommen von IS256, <i>icaA/D</i> , <i>mecA</i> und <i>agr</i> in den Sequenztypen	41
3.5.2	Phylogenetische Verwandtschaft ausgewählter <i>S. epidermidis</i> -Isolate.....	42
4	Diskussion	44
4.1	Das Resistenzprofil der Isolate.....	44
4.2	Biofilmbildung	45
4.3	Insertionselement IS256	47
4.4	<i>agr</i> -Gruppenspezifität.....	48
4.4.1	<i>agr</i> -Gruppenspezifität in Abhängigkeit vom Resistenzverhalten	49

4.5	SCC <i>mec</i> -Typ	50
4.5.1	Korrelation der SCC <i>mec</i> -Typen mit der Antibiotikaresistenz	51
4.5.2	SCC <i>mec</i> -Typ bei Multiresistenz	52
4.5.3	Korrelation zwischen SCC <i>mec</i> -Typ und der <i>agr</i> -Gruppe	52
4.5.4	Zuordnung zur <i>agr</i> -Gruppe und zum SCC <i>mec</i> -Typ in Abhängigkeit von der Materialart	53
4.6	Analyse des Sequenztyps	54
4.6.1	Verwandtschaft der Sequenztypen	55
4.7	Ausblick	56
	Zusammenfassung	58
	Literaturverzeichnis	59
	Danksagung	67
	Ehrenerklärung	68
	Lebenslauf	69
	Anlagen	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kolonien von <i>S. epidermidis</i> auf Columbia-Blut-Agar	1
Abbildung 2: Biofilmbildung und beteiligte Komponenten	4
Abbildung 3: Organisation des <i>icaA/D</i> -Operons.....	5
Abbildung 4: Organisation des <i>agr</i> -Operons.....	7
Abbildung 5: Art der Materialien, aus denen die <i>S. epidermidis</i> -Isolate gewonnen wurden...25	
Abbildung 6: Häufigkeit von ausgewählten Resistenzprofilen	26
Abbildung 7: Kultivierung auf Kongorot-Agar	27
Abbildung 8: Häufigkeit der Biofilmbildung bei den verschiedenen Materialarten.....28	
Abbildung 9: Duplex-PCR zur Untersuchung auf den <i>ica</i> -Genkomplex.....29	
Abbildung 10: Biofilmbildung in Abhängigkeit vom Vorhandensein des <i>ica</i> -Genkomplexes ..30	
Abbildung 11: PCR zur Untersuchung der <i>S. epidermidis</i> -Isolate auf das Insertionselement IS256.....31	
Abbildung 12: Nachweis des Insertionselementes IS256.....31	
Abbildung 13: Multiplex-PCR zur Untersuchung der <i>agr</i> -Gruppen.....32	
Abbildung 14: <i>agr</i> -Gruppenspezifität der <i>S. epidermidis</i> -Isolate	32
Abbildung 15: Multiplex-PCR zur Bestimmung des SCC <i>mec</i> -Typs.....33	
Abbildung 16: Häufigkeiten der SCC <i>mec</i> -Typen.....34	
Abbildung 17: Korrelation der SCC <i>mec</i> -Typen mit Antibiotikaresistenz	34
Abbildung 18: Korrelation zwischen <i>agr</i> -Gruppenspezifität und SCC <i>mec</i> -Typ.....35	
Abbildung 19: Häufigkeit der <i>agr</i> -Gruppen bei multiresistenten <i>S. epidermidis</i> -Isolaten	36
Abbildung 20: Häufigkeit der SCC <i>mec</i> -Typen bei multiresistenten <i>S. epidermidis</i> -Isolaten ..37	
Abbildung 21: Korrelation zwischen der <i>agr</i> -Gruppe und dem SCC <i>mec</i> -Typ bei multiresistenten <i>S. epidermidis</i> -Isolaten	38
Abbildung 22: phylogenetische Verwandtschaft der am häufigsten nachgewiesenen Sequenztypen von <i>S. epidermidis</i>	42
Abbildung 23: phylogenetische Verwandtschaft von <i>S. epidermidis</i>43	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herkunft der <i>S. epidermidis</i> -Isolate	14
Tabelle 2: Primer zur <i>agr</i> -Typisierung.....	18
Tabelle 3: Amplifikationszyklus von <i>agr</i>	18
Tabelle 4: Primer zur Identifikation von IS256	18
Tabelle 5: Amplifikationszyklus von IS256.....	18
Tabelle 6: Primer zur <i>icaA/D</i> -Typisierung	19
Tabelle 7: Amplifikationszyklus von <i>icaA/D</i>	19
Tabelle 8: Primer zur SCC <i>mec</i> -Typisierung.....	20
Tabelle 9: Zuordnung zum SCC <i>mec</i> -Typ.....	21
Tabelle 10: Amplifikationszyklus von SCC <i>mec</i>	21
Tabelle 11: Oligonukleotide zur Genotypisierung von <i>S. epidermidis</i>	22
Tabelle 12: Amplifikationszyklus der <i>housekeeping genes</i>	22
Tabelle 13: Untersuchung der Biofilmbildung und des <i>ica</i> -Genkomplexes.....	29
Tabelle 14: Verteilung der <i>agr</i> -Gruppen in den verschiedenen Untersuchungsmaterialien ...	39
Tabelle 15: Verteilung der SCC <i>mec</i> -Typen in den verschiedenen Untersuchungsmaterialien	39
Tabelle 16: Multisequenzanalyse der selektierten <i>S. epidermidis</i> -Isolate.....	40
Tabelle 17: Sequenztypen der <i>S. epidermidis</i> -Isolate und deren genetischer Determinanten	41

Abkürzungsverzeichnis

<i>Aap</i>	<i>accumulation associated protein</i> (Akkumulation-assoziertes Protein)
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
AE-Puffer	Elutionspuffer
AL-Puffer	Lysis-Puffer
AW-Puffer 1,2	<i>Wash Buffer</i> 1,2
BK	Blutkultur
AIP	<i>autoinducing Peptid</i>
<i>AtlE</i>	Autolysin E
<i>Bap</i>	<i>biofilm-associated protein</i> (Biofilm-assoziertes Protein)
<i>ccr</i>	<i>cassette chromosome recombinase</i>
CIP	Ciprofloxacin
CLI	Clindamycin
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i>
EB-Puffer	Elutionspuffer
ERY	Erythromycin
<i>Fbp</i>	<i>fibrinogen-binding protein</i> (Fibrinogen-bindendes-Protein)
GEN	Gentamicin
<i>ica</i>	<i>intercellular adhesin</i>
IS256	Insertionslement 256
IUD	<i>intrauterine-device</i>
Kath.	Katheter
<i>MLST</i>	<i>Multilocus Sequenze Typing</i>
MRSE	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus epidermidis</i>
n.g.	nicht getestet
NT	nicht typisierbar
OXA	Oxacillin
P	Promotor
PB-Puffer	<i>Purification Buffer</i>
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE-Puffer	Waschpuffer
PEN	Penicillin
PIA	<i>polysaccharide intercellular adhesin</i>
RNA	<i>Ribonucleinacid</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i>
SCC <i>mec</i>	<i>staphylococcal cassette chromosome mec</i>
ST	Sequenztyp
SXT	Cotrimoxazol
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEP	Totalendoprothese
TET	Tetrazyklin
VA	Varialabor
ZVK	zentraler Venenkatheter

1 Einführung

1.1 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylokokken sind grampositive, nicht sporenbildende Kugelbakterien und ordnen sich aufgrund der Unbeweglichkeit meist in Haufen oder Trauben an (Hof *et al.* 2009).

Koagulase-negative Staphylokokken, wie *S. epidermidis*, werden von *S. aureus* und *S. intermedius* durch das Fehlen des Enzyms Koagulase unterschieden (Hof *et al.* 2009, Otto 2009). Die Einteilung anhand der Plasmakoagulase stammt von Datány um ca. 1926 (Stock 2007). Die folgende Abbildung (Abbildung 1) zeigt typische Kolonien von verschiedenen *S. epidermidis*-Isolaten auf Columbia-Blut-Agar.

Staphylokokken gehören zur Familie der Mikrokokken und bilden Katalase (Huebner *et al.* 1999). Es werden über 60 verschiedene Staphylokokken-Spezies und Subspezies unterschieden, wovon jedoch nur ca. 14 Koagulase-negative Spezies eine humanpathogene Bedeutung beigemessen wird (Huebner *et al.* 1999, Ghebremedhin 2009).



Abbildung 1: Kolonien von *S. epidermidis* auf Columbia-Blut-Agar

S. epidermidis ist Teil der Mikroflora des Menschen und über den gesamten Körper verteilt (Kloos *et al.* 1994, Steinacker 2004, Otto 2009). Möglicherweise verhindert diese Spezies die Besiedlung durch andere Pathogene (Otto 2009). Man hielt *S. epidermidis* lange Zeit für ein apathogenes Bakterium, doch inzwischen ist bekannt, dass Koagulase-negative Staphylokokken, insbesondere *S. epidermidis*, eine häufige Ursache für Plastikinfektionen und noso-

komiale Infektionen darstellen (Jarvis *et al.* 1992, Steinacker 2004, Batzilla 2006, Hof *et al.* 2009). Die Bedeutung von Koagulase-negativen Staphylokokken nimmt aufgrund der verbreiteten Anwendung von Implantaten zu (Kloos *et al.* 1994). Interessanterweise berichteten Hudetz *et al.* (2008), dass die Metallart des Implantats keinen maßgebenden Einfluss auf die Anfälligkeit und die Persistenz einer Infektion hat.

Auf deutschen Intensivstationen werden etwa ein Drittel der ZVK-assoziierten Septikämien durch Koagulase-negative Staphylokokken verursacht (Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) 2011).

S. epidermidis versucht der Immunantwort auszuweichen und der Infektionsverlauf ist eher chronisch (Vuong *et al.* 2002, Otto 2004). Die Biofilmbildung gilt als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* (Mack *et al.* 1992, Heilmann *et al.* 1997).

1.2 Biofilmbildung

Ein Biofilm ist eine Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen, die sich durch Bildung einer Matrix in engem Kontakt zueinander und zu diversen Oberflächenstrukturen befinden (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Mikroorganismen im Biofilm sind resistenter gegen Einwirkungen von antimikrobiellen Substanzen (Presterl 2009). Bereits Christensen *et al.* (1985) stellten fest, dass *S. epidermidis*-Isolate, die eine Sepsis verursachten, adhärenter sind als Isolate von der Haut.

1.2.1 Die initiale Adhärenz

Die Biofilmbildung gilt als wichtiger Pathogenitätsfaktor von *S. epidermidis* und verläuft in mehreren Phasen, die in Abbildung 2 dargestellt sind (Christensen *et al.* 1990).

Für die erste Phase der Biofilmbildung, der primären Adhäsion, sind besonders ionische und hydrophobe Wechselwirkungen entscheidend (Vuong *et al.* 2002, Batzilla 2006). Man kann diese erste Phase nochmals unterteilen (Vuong *et al.* 2002).

Findet die primäre Anhaftung an einer nicht umhüllten Kunststoffoberfläche statt, so sind dafür besonders das Autolysin E (*AtlE*, Interaktion über hydrophobe Wechselwirkungen), elektrostatische Wechselwirkungen (Interaktion mit Teichonsäuren) und Van der Waal's Kräfte verantwortlich (Vuong *et al.* 2002). Das Autolysin E ist ein oberflächenassoziiertes Protein und gleichzeitig Autolysin und Adhäsion, welches an Vitronectin binden kann und am hydrophoben Charakter der Zelloberflächen beteiligt ist (Heilmann *et al.* 1997, Vuong *et al.* 2002, Götz 2002, Otto 2009).

Findet die primäre Anhaftung an einer bereits umhüllten Kunststoffoberfläche statt, so sind dafür u.a. das Fibrinogen-bindende Protein (*fibrinogen-binding protein, Fbp*) verantwortlich,

ein 119-kDa großes Protein, welches an Fibrinogen bindet (Nilsson *et al.* 1998, Vuong *et al.* 2002). Weiterhin beteiligt ist wiederum das *AtfE*, das an Vitronectin bindet (Heilmann *et al.* 1997, Vuong *et al.* 2002, Otto 2009).

1.2.2 Die Akkumulationsphase

Die zweite Phase der Biofilmbildung ist die Akkumulationsphase. Dafür sind zum einen das *polysaccharide intercellular Adhesin* (PIA) und zum anderen das Akkumulation-assoziierte Protein (*accumulation-associated protein, Aap*) notwendig. Von einigen Autoren wird auch noch das Biofilm-assoziierte Protein (*biofilm-associated protein, Bap*) genannt (Hussain *et al.* 1997, Tormo *et al.* 2005, Rohde *et al.* 2005, Batzilla 2006, Otto 2009). Das Akkumulation-assoziierte Protein (*accumulation-associated protein, Aap*) ist, wie auch das Biofilm-assoziierte Protein (*biofilm-associated protein, Bap*), ein Zellwand verankertes Protein (Bowden *et al.* 2006). Beide Proteine spielen möglicherweise im Rahmen der Biofilmbildung eine wichtige Rolle bei der interzellulären Adhäsion (Hussain *et al.* 1997, Tormo *et al.* 2005, Rohde *et al.* 2005, Otto 2009). Eine wesentliche Voraussetzung für die Akkumulation ist das *polysaccharide intercellular Adhesin* (PIA). Dabei sind zwei Polysaccharidfraktionen voneinander differenzierbar (Mack *et al.* 1996, Mack 1999). Das Polysaccharid I bildet einen Anteil von über 80 %. Es ist ein lineares Homoglykan und besteht aus ungefähr 130 β -1,6-verknüpften 2-Desoxy-2-amino-D-glucopyranosyl-Einheiten. Etwa 85 % der Untereinheiten sind N-acetyliert und 15 % nicht N-acetyliert und somit positiv geladen (Mack *et al.* 1996, Mack 1999, Cho 2001).

Das Polysaccharid II hat einen Anteil von unter 20 % und ist dem Polysaccharid I sehr ähnlich (Mack *et al.* 1996, Mack 1999). Es hat jedoch einen geringeren Anteil an nicht N-acetylierten Untereinheiten und enthält zudem Phosphat und Succinat. Auf Grund dessen zeigt es ein eher anionisches Verhalten (Mack *et al.* 1996, Mack 1999).

1.2.3 Die Phase der Ablösung

Da das Wachstum eines Biofilmes unter anderem limitiert ist durch das Angebot an Nährstoffen und Sauerstoff, dem pH-Wert und der Osmolarität, kommt es schließlich zu einer Ablösung von Zellen aus dem Biofilm (Dunne 2002). Des Weiteren ist eine Ablösung vom Biofilm sinnvoll, um andere Orte zu kolonisieren und eine Ausbreitung der Infektion zu realisieren (O'Toole *et al.* 2000, Dunne 2002).

Die Ablösung wird möglicherweise von *agr* kontrolliert, da Isolate ohne *agr* einen dickeren Biofilm bilden und größere Schwierigkeiten mit der Ablösung haben (Vuong *et al.* 2003, 2004b, Otto 2009). Zwei Formen der Ablösung sind denkbar. Eine Möglichkeit ist die enzymatische Spaltung des Biofilms durch Interaktion von Detergenzien-ähnliche-Molekülen (Otto 2009). Eine weitere Möglichkeit ist die Spaltung nicht-kovalenter Bindungen (wie elektrostati-

sche Kräfte) zwischen PIA und der Polymeroberfläche durch Detergenzien-ähnliche Moleküle (Otto 2009). Möglicherweise ist das δ -Toxin an der Ablösung beteiligt (Vuong *et al.* 2002, 2003). Dieses Toxin wird vom *hld*-Gen kodiert, welches im *agr*-Operon verankert ist (Otto *et al.* 1998).

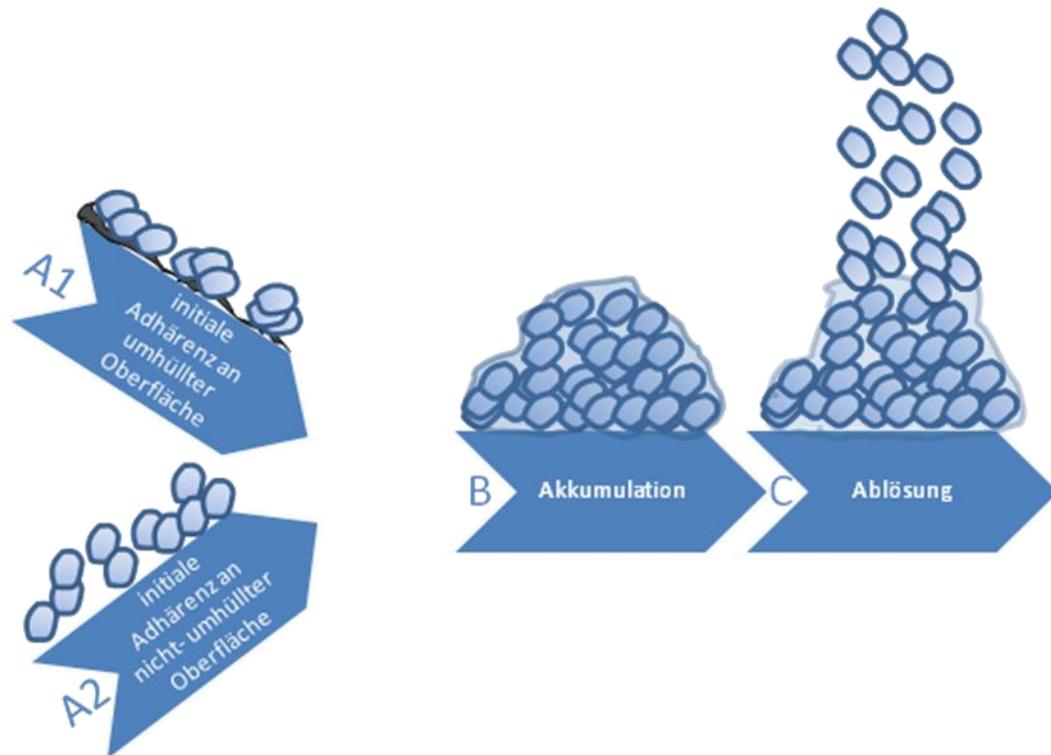


Abbildung 2: Biofilmbildung und beteiligte Komponenten,
modifiziert nach Vuong *et al.* 2002, Otto 2009

Findet die initiale Adhärenz an einer umhüllten Oberfläche statt (Abbildung 2, A1), so sind für die Verbindung u.a. das Fibrinogen-bindende-Protein (*Fbp*) und das Autolysin E verantwortlich. Bei einer nicht umhüllten Kunststoffoberfläche (Abbildung 2, A2) sind an der Anheftung Van der Waal's Kräfte, elektrostatische Kräfte und ebenfalls das Autolysin E beteiligt. An der Akkumulation (Abbildung 2, B) ist das *polysaccharide intercellular Adhesin* (PIA) und das Akkumulation-assoziierte Protein (*accumulation-associated protein, Aap*) beteiligt. Einige Autoren (s. 1.2.2.) machen auch das Biofilm-assoziierte Protein (*biofilm-associated protein, Bap*) für die Akkumulation mitverantwortlich. An der Ablösung (Abbildung 2, C) sind wahrscheinlich das δ -Toxin und weitere Faktoren beteiligt.

1.3 Das *intercellular adhesin-(ica)* Operon

Das *polysaccharide intercellular Adhesin* (PIA) wird vom *ica*-Operon kodiert (Heilmann *et al.* 1996, Ziebuhr *et al.* 1997). *Ica* ist ein wichtiger Virulenzmarker. Es wird von einigen Arbeitsgruppen angenommen, dass Stämme mit hoher PIA-Produktion dementsprechend eine hohe Virulenz haben (Arciola *et al.* 2001, Li *et al.* 2005). Hudetz *et al.* (2008) hingegen stellten fest, dass der Einfluss von *ica* auf die Biofilmbildung *in vitro* sehr viel größer ist als *in vivo*.

Das *ica* Operon, *icaADBC*, enthält die Gene für die PIA-Produktion (O'Gara *et al.* 2001, Heilmann *et al.* 1996). Die Organisation des Operons ist in Abbildung 3 dargestellt. *IcaA* ist ein Transmembranprotein und hat eine N-Acetylglucosamyl-Transferase-Aktivität (Heilmann *et al.* 1996, Gerke *et al.* 1998, Mack 1999, Cho 2001, Vuong *et al.* 2002, Götz 2002). *IcaA* hat allein nur wenig Transferase-Aktivität, die bei Koexpression mit *icaD* massiv gesteigert wird (Gerke *et al.* 1998, Cho 2001). Vermutlich hat *icaD* die Funktion eines Chaperons (Gerke *et al.* 1998, Götz 2002). *IcaC* ist ein hydrophobes integrales Membranprotein und ermöglicht in Kombination mit *icaA/D* wesentlich längere Oligomerketten (Heilmann *et al.* 1996, Gerke *et al.* 1998, Batzilla 2006). Weiterhin wird vermutet, dass es auch eine Exportfunktion hat (Götz 2002, Vuong *et al.* 2002, 2004a). *IcaB* ist an der Zelloberfläche lokalisiert und ist möglicherweise für die Deacetylierung von N-Acetylglucosamin verantwortlich, das erst dadurch kationische Eigenschaften erwirbt. Diese sind wiederum wichtig für die Oberflächenhaftung und Kolonisierung (Vuong *et al.* 2004a).



Abbildung 3: Organisation des *icaA/D*-Operons (modifiziert nach O'Gara *et al.* 2001)

Das fünfte Gen, *icaR*, liegt stromaufwärts von *icaA* und wird abweichend von *icaADBC* transkribiert (O'Gara *et al.* 2001). Es ist wahrscheinlich ein negativer Regulator von *icaADBC* (Götz 2002, Conlon *et al.* 2002).

Ica wird durch Natriumchlorid und Glucose unabhängig von *icaR* gering induziert, wohingegen Ethanol durch eine Inhibition der *icaR*-Transkription die *ica*-Transkription steigert (Conlon *et al.* 2002, Knobloch *et al.* 2004). Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die *ica*-Expression haben, sind die Temperatur, Osmolarität und subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika wie Tetrazykline, Quinupristin-Dalfopristin, Clindamycin etc. (Rachid *et al.* 2000, Dobinsky *et al.* 2003, Batzilla 2006).

1.4 Das Insertionselement IS256

IS256 ist ein Teil von dem zusammengesetzten Transposon *Tn4001*, welches u.a. die Gentamicinresistenz in Staphylokokken vermitteln kann (Lyon *et al.* 1987, Cho 2001, Kozitskaya *et al.* 2004). Es kommt aber auch in vielen Kopien im Chromosomensatz von Aminoglykosid-resistenten Staphylokokken vor (Dyke *et al.* 1992, Rice *et al.* 1994, Ziebuhr *et al.* 1999). IS256 wurde als Marker zur Untersuchung von invasiven und kommensalen *S. epidermidis*-Stämmen herangezogen (Gu *et al.* 2005).

Die Inaktivierung von *ica* durch IS256 im Sinne einer Phasenvariation verursacht häufig eine fehlende Biofilmbildung (Ziebuhr *et al.* 1999, Cho 2001). Die Insertion von IS256 findet dabei vorwiegend in das *icaC* Gen statt, selten wurde eine Insertion in *icaA* und *icaB* detektiert (Ziebuhr *et al.* 1999). Infolgedessen kann das Isolat kein *polysaccharide intercellular Adhesin* (PIA) bilden (Ziebuhr *et al.* 1999). Die Insertion ist vollständig reversibel, sodass nach der Exzision wieder ein biofilmbildender Phänotyp entsteht (Ziebuhr *et al.* 1999).

1.5 Das *accessory gene regulator-(agr)* System

Das *accessory gene regulator-(agr)* System wurde auch in nicht-pathogenen *S. epidermidis*-Isolaten nachgewiesen, sodass es nicht nur als Regulator von Virulenzfaktoren anzusehen ist, sondern als *Quorum-sensing*-System, welches vielerlei Gene wachstumsabhängig reguliert (Otto 2001, 2004). Das *agr*-System wird im Übergang der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase durch Autoregulationsmechanismen aktiviert (Ji *et al.* 1997, Otto *et al.* 1998, Li *et al.* 2004).

Die Organisation des *agr*-Operons ist in Abbildung 4 dargestellt. Die RNA II, kontrolliert vom Promotor P2, kodiert für ein Zweikomponentensystem und einen autoinduzierenden Peptid-Liganden (Novick *et al.* 1995). Das Zweikomponentensystem besteht aus *agrA* und *agrC*. Nachdem das Pheromon an *agrC*, einer Histidin-Kinase, gebunden hat, wird *agrA* phosphoryliert (Otto *et al.* 1998, Lina *et al.* 1998, Novick 2003, Otto 2004). Anschließend bindet *agrA* an die DNA und induziert die Transkription von RNA II und RNA III (Ji *et al.* 1995, Koenig *et al.* 2004). Die Struktur des autoinduzierenden Peptids (AIP) wird von *agrD* kodiert. Durch die enzymatische Wirkung eines sekretorischen Proteins, dem Produkt von *agrB*, wird das Pro-AIP posttranslational verändert (Ji *et al.* 1995, Cho 2001, Novick 2003, Koenig *et al.* 2004, Batzilla 2006).

RNA III, kontrolliert vom Promotor P3, ist das Effektor-Molekül des *agr*-Systems. Die Synthese ist abhängig von der *agr*-Aktivierung (Janzon *et al.* 1990, Novick *et al.* 1993, 1995). Es ist nicht bekannt, wie RNAIII die Transkription der Ziel-Gene von *agr* reguliert (Vuong *et al.*

2003, Otto 2004). Weiterhin kodiert RNA III für das δ -Toxin im *hld*-Gen (Otto *et al.* 1998, Vuong *et al.* 2002, 2003).



Abbildung 4: Organisation des *agr*-Operons (modifiziert nach Otto 2004)

1.5.1 Pheromone

Pheromone sind sieben bis neun Aminosäuren lang und haben eine Thiolacton-Bindung zwischen einem zentralen Cystein und der C-terminalen Carboxylgruppe. Diese Thiolactonring-Struktur ist nötig für die biologische Aktivität (Otto *et al.* 1998, Mayville *et al.* 1999, Otto 2004). Die Pheromone induzieren das *agr*-System durch Interaktion mit der Histidin-Kinase *agrC* (Otto 2001). Generell ist festzustellen, dass Pheromone das eigene *agr*-System aktivieren bzw. das fremde *agr*-System reprimieren (Ji *et al.* 1997, Otto *et al.* 2001, Otto 2001, Vuong *et al.* 2002, 2003). Pheromone von *S. epidermidis* sind potente Inhibitoren des *agr*-Systems von *S. aureus* und hemmen somit die Expression von Virulenzfaktoren in *S. aureus* (Otto *et al.* 1999).

1.5.2 Targets der *agr*-Regulation

Das *agr*-System ist verantwortlich für die Heraufregulation vieler Exoproteine sowie für die Herunterregulation von Zelloberflächenproteinen und Oberflächen-assoziierten Proteinen (Novick *et al.* 1995, Vuong *et al.* 2000a). In der frühen Phase der Infektion, in der eine geringe Zelldichte vorherrscht, werden Bindungsproteine synthetisiert. Bei steigender Zelldichte kommt es durch Aktivierung des *agr*-Systems zur Synthese von Exoproteinen und es werden vermehrt Gewebe-zerstörende Enzyme produziert (Vuong *et al.* 2000a).

Das *agr*-System ist anscheinend ein negativer Regulator des *AtlE* und obwohl *agr* in der frühen exponentiellen Wachstumsphase nur geringe Aktivität zeigt, scheint diese für eine Hemmung der Expression von *AtlE* auszureichen (Otto *et al.* 1998, Vuong *et al.* 2003).

Das δ -Toxin führt zu einer verminderten Adhärenz an Polystyren. Da das δ -Toxin vom *agr*-Operon kodiert wird, ist dies also ein weiterer Mechanismus zur Regulation der Biofilmbildung (Vuong *et al.* 2003).

Vuong *et al.* (2003) ermittelten weiterhin, dass das *agr*-System nicht an der Regulation von dem *polysaccharide intercellular Adhesin* (PIA) beteiligt ist.

Da es bei *S. epidermidis* drei verschiedene *agr*-Gruppen gibt, stellt sich die Frage, ob bestimmte *agr*-Gruppen besonders häufig mit ausgewählten Isolationsorten korrelieren und ob es eine Assoziation von Pathogenität und bestimmten *agr*-Gruppen gibt (Dufour *et al.* 2002).

1.6 Der staphylococcal cassette chromosome *mec*-(SCC*mec*) Komplex

Das *mecA*-Gen, welches im SCC*mec*-(staphylococcal cassette chromosome *mec*) Komplex integriert ist, kodiert für das Penicillin-bindende Protein *PBP2a*, welches die Resistenz gegenüber Oxacillin und andere Betalaktam-Antibiotika vermittelt, da diese Antibiotika an das *PBP2a* nur eingeschränkt binden können (Chambers *et al.* 1985, Chambers 1997, Katayama *et al.* 2000, Cho 2001, Ito *et al.* 2003, Mombach Pinheiro Machado *et al.* 2007, Ruppé *et al.* 2009).

Fernerhin sind zwei Regulationselemente, *mecI* und *mecR1*, in diesen Komplex integriert (Chambers 1997, IWG-SCC 2009). In *S. aureus* kodiert das *mecI* Gen für ein Repressorprotein, während das *mecR1* Gen für ein β -Lactam-sensing Transmembran-Signalprotein kodiert (Hiramatsu *et al.* 1992, Chambers 1997, Petinaki *et al.* 2001). Befinden sich Betalaktam-Antibiotika in der Umgebung, wird dies von *mecR1* erkannt und es hebt die Hemmung der *mecA*-Transkription durch Ablösung der *mecI*-Repressorproteine von der Operatorregion auf (Sharma *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2001, Geisel *et al.* 2003).

Weiterhin gehören *cassette chromosome recombinase*-(*ccr*) Gene, die für Rekombinasen die chromosomale Integration und Exzision kodieren, zum SCC*mec*-Komplex (Katayama *et al.* 2000, Geisel *et al.* 2003, Ruppé *et al.* 2009). Bisher unterscheidet man mehrere *ccr*-Allotypen (Katayama *et al.* 2000, Ito *et al.* 2001, 2004, Oliveira *et al.* 2006, Descloux *et al.* 2008, IWG-SCC 2009). Aus der Kombination der Klasse des *mec*-Komplexes sowie des *ccr*-Typs ergibt sich der SCC*mec*-Typ (Ito *et al.* 2001, IWG-SCC 2009). Da diese Elemente bei Koagulase-negative Staphylokokken jedoch sehr unterschiedlich sein können, gelingt es bisweilen nicht, Isolate eindeutig zuzuordnen und diese werden dann als nicht typisierbar bezeichnet (Mombach Pinheiro Machado *et al.* 2007, Ruppé *et al.* 2009, Garza-González *et al.* 2010, Iorio *et al.* 2012).

Neben dem *mec*-Komplex und dem *ccr*-Gen-Komplex enthält das SCC*mec*-Element noch eine sogenannte J-Region, die weitere Resistenzgene tragen kann (IWG-SCC 2009). Bei Koagulase-negativen Staphylokokken werden zahlreiche SCC*mec*-Typen voneinander unterschieden (Ziebuhr *et al.* 2006, Mombach Pinheiro Machado *et al.* 2007).

Die SCC*mec*-Kassette kann neben der Resistenz gegen Oxacillin auch andere Resistenzen übertragen und dient möglicherweise als System zum Informationsaustausch (Ito *et al.* 2001). Weiterhin wird vermutet, dass die SCC*mec*-Kassette zwischen verschiedenen Isolaten und Spezies mittels horizontalen Gentransfer übertragen werden kann (Wisplinghoff *et al.* 2003, Hanssen *et al.* 2004, Miragaia *et al.* 2005, 2007, 2009).

1.7 Analyse des Sequenztyps

Zur Genotypisierung bakterieller Isolate wird das Verfahren *Multilocus Sequence Typing* (MLST) genutzt, wobei eine Sequenzanalyse von insgesamt sieben Haushaltsgenen (*housekeeping genes*) durchgeführt wird (<http://sepidermidis.mlst.net/>). Anschließend lassen sich hiermit die phylogenetische Verwandtschaft von bakteriellen Isolaten ermitteln und Abstammungsverhältnisse aufklären (Fitzgerald *et al.* 2001, Urwin *et al.* 2003, Wisplinghoff *et al.* 2003, Kozitskaya *et al.* 2005). Thomas *et al.* (2007) verglichen drei MLST-Schemata miteinander und ermittelten die sieben charakteristischsten Haushaltsgene für *S. epidermidis*. Diese sind die Carbamat Kinase (*arcC*), die Shikimat-Dehydrogenase (*aroE*), der ABC Transporter (*gtr*), das DNA-Mismatch-Reparaturprotein (*mutS*), das Pyrimidin Operon Regulations Protein (*pyrR*), die Triosephosphat Isomerase (*tpiA*) und die Acetyl-Coenzym-A Acetyltransferase (*yqiL*) (Thomas *et al.* 2007, <http://sepidermidis.mlst.net/>). Miragaia *et al.* (2008) ermittelten MLST nach der *Pulsed-Field-Gelelektrophorese* als Methode mit der höchsten Diskriminationsfähigkeit bezüglich der Abstammung, der Populationsstruktur und der Epidemiologie von *S. epidermidis*.

1.8 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es Untersuchungen zu *agr*-Genotypen, IS256, Biofilmbildung und SCC*mec*-Typen von *Staphylococcus epidermidis* durchzuführen und diese in Korrelation zueinander abzubilden, um die Schwere der Infektion in Assoziation mit diesen genetischen Determinanten zu beurteilen.

Daher wurden folgende Aspekte untersucht:

- Resistenzverhalten der Isolate
 - genotypische und phänotypische Fähigkeit zur Biofilmbildung sowie die Korrelation beider zueinander
 - das Insertionselement IS256 und dessen Assoziation mit Pathogenität
 - Bestimmung der *agr*-Gruppe und des SCC*mec*-Typs
 - mögliche Assoziation zwischen der *agr*-Gruppe bzw. dem SCC*mec*-Typ und dem Isolationsort
-

-
- mögliche Assoziation zwischen der *agr*-Gruppe bzw. dem *SCCmec*-Typ und dem Auftreten von Multiresistenz
 - Korrelation zwischen den *agr*-Gruppen und *SCCmec*-Typen
 - Assoziation bestimmter *SCCmec*-Typen und Antibiotikaresistenz
 - Sequenztypen einiger multiresistenter Isolate und Generierung eines Dendrogrammes der am Universitätsklinikum der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg zirkulierenden *S. epidermidis*-Klone
-

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Brutschrank für Bakterien	Typ B 5050 E, Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	BioRad (München)
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)
Ionenaustauscheranlage	Milli-Q ^{UF} PLUS (Millipore)
Kühlzentrifugen	Sigma 3K20, 6K10 RC 2B, Sorvall
Magnetrührer	Omnilab, Heidolph MR 2002
Mikroskop	Laborlux 11 (Leitz) ULWCD (Olympus, Tokyo, Japan)
Mikrotestplattenleser	MR 6500, Dynatech (Denkendorf)
Mischgerät ("Vortexer")	Reax 2000 (neoLab, Heidelberg)
NanoDrop ND1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
pH-Meter	CG 820 (Schott, Göttingen)
Phosphorimager	Modell GS 250 (Biorad)
Schüttelinkubator (Bakterien)	Certomat H (Braun, Melsungen)
Schwenkgerät	Bellydancer (Stovall, Greensboro, USA)
Spannungsgerät	Desagatronic 2000/300 (Desaga, Heidelberg)
Sterilwerkbank	HeraSAFE, Heraeus
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) DYAD DISCIPLINE TM , MJ Research [®]
UV-Transilluminator <i>Gel Logic 100 Imaging System</i>	Kodak, Stuttgart, Deutschland Copy Processor (Mitsubishi)
Waagen	1204 MP, 1265 MP, 1602MP (Sartorius, Göttingen)

Zentrifugen	Centrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg) Kühlzentrifugen 2K15, 3K20 und 3K30 (Sigma, Osterode) Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotor JA-14 (Beckmann, München) Kühlzentrifuge RT 6000B (DuPont Sorvall Instruments, Nemours GmbH, Bad Homburg) Ultrazentrifuge TL-100 mit Rotor TLA 100.3/1468 (Beckmann, München) Zellzentrifuge RT 6000, Dupont (Ghebremedhin 2009)
-------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.2 Plastikmaterialien und Zubehör

Eppendorf, Hamburg	Kristallspitzen (10 µl) Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)
Greiner, Nürnberg	Plastik-Einmalpipetten (2, 10 und 25 ml), Ösen steril (SAL 10 ⁻³)
Landgraf, Langenhagen	PCR-Gefäße (500 µl)
Nunc, Wiesbaden	Immunoplate (96 wells, Rundboden) Plastikröhrchen (10 ml, 50 ml) Zentrifugationsröhrchen (15 ml mit Schraubdeckel)
Sarstedt, Nümbrecht	Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl) Reaktionsgefäße (1,5 ml) (Ghebremedhin 2009)

2.3 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien, Puffer, Lösungen und Kits

2.3.1 Enzyme und Reagenzien

DNAse I, RNase-frei, 5 U/µl	Roche Diagnostics
Lysostaphin, Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K, dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim

Taq-DNA-Polymerase Kit Qiagen, Hilden
TaKaRa *Ex Taq* DNA Takara Bio, Otsu, Japan
Polymerase Kit
(Ghebremedhin 2009)

2.3.2 Chemikalien und Lösungen

Von den Firmen Serva, Sigma, Roth, Merck, MWG, MBI, Baker, Fluka, Biomol, Promega und Pharmacia wurden die Chemikalien und Lösungen erworben (Qualitätsstufe „Für die Molekularbiologie“, RNase-frei). Andernfalls wurde dies gesondert erläutert (Ghebremedhin 2009).

2.3.3 Käuflich erworbene Kits

BigDye Terminator Sequencing Applied Biosystems, Foster City, USA
Kit HiDi Formamide

PCR Purification Kit; DyeEx 2.0 Qiagen, Hilden
Spin Kit; QIAshredder u. QIAamp
DNA Mini Kit; QIAquick
(Aufreinigungskit)
(Ghebremedhin 2009)

2.3.4 Puffer und Lösungen

TE-Puffer
10 mM Tris-HCL pH 8,0
1 mM EDTA
(Ghebremedhin 2009)

2.3.5 Käuflich erworbene Fertigpuffer, Fertiglösungen und Fertigmedien

EDTA (0,5 M, pH 8,0) Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid (10 mg/ml) ROTH, Karlsruhe
1 M Tris-HCl pH
7,0/7,2/7,4/7,6/7,8/8,0
(Ghebremedhin 2009)

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Größenmarker wurden bei der Firma Fermentas käuflich erworben (Ghebremedhin 2009).

2.4 Nährböden und Bakterienstämme

2.4.1 Nährböden

Die Anzucht der Bakterien (*S.epidermidis*) erfolgte auf Columbia-Blut-Agar.

Columbia-Blut-Agar: Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Ghebremedhin 2009)

Kongorot-Agar wurde zum Nachweis der Biofilmbildung beimpft.

Kongorot-Agar: 37 g Brain Heart Infusion Broth (BHI)
mit 15g Agar in 800ml H₂O dest. lösen,
36 g Saccharose in 100 ml H₂O dest. lösen,
800 mg Kongorot in 100 ml H₂O dest. lösen.

Alle Lösungen wurden getrennt autoklaviert. Danach wurden sie steril vermischt und schließlich in Petrischalen gegeben (Ghebremedhin 2009).

2.4.2 *S. epidermidis*-Isolate

Im Zeitraum von April 2008 bis Februar 2009 wurden im Institut für Mikrobiologie an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg insgesamt 200 *S. epidermidis*-Isolate gesammelt.

Aus Blutkulturen wurden 64 *S. epidermidis*-Isolate gewonnen. 44 der übrigen Isolate konnten aus Gewebeproben gewonnen werden, wobei es sich sowohl um intraoperatives Material und Abszessmaterial, als auch um Punktionsmaterial handelte. Aus Implantaten, wie Prothesenmaterial aus der Orthopädie, IUD (*intrauterine-device*) sowie Herzschrittmachermaterial konnten 13 *S. epidermidis*-Isolate angezüchtet werden. 51 Isolate stammten aus Zentralvenenkathetern und 28 Isolate konnten von anderen Kathetermaterialien gewonnen werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Herkunft der *S. epidermidis*-Isolate

BK		VA							
Blutkulturen		zentraler Venenkatheter		Gewebe ¹		Drain / andere Katheter		Implantate ²	
<i>n</i>	Anteil [%]	<i>n</i>	Anteil [%]	<i>n</i>	Anteil [%]	<i>n</i>	Anteil [%]	<i>n</i>	Anteil [%]
64	32	51	25,5	44	22	28	14	13	6,5

¹ intraoperatives Material, Punktatmaterial, Abszessmaterial

² TEP Material, Schrittmachermaterial, IUD (*intrauterine-device*)

2.5 Phänotypische Methoden

2.5.1 Kultivierung von *S. epidermidis* auf Columbia-Blutagar

Die *S. epidermidis*-Isolate wurden über Nacht auf Columbia-Blut-Agar bei 37 °C angezüchtet (Abbildung 1). Dafür wurden eingesandte Primärmaterialien verwendet. Zur Stammerhaltung wurden Kryokulturen angelegt (Cryobank, Mast Diagnostica, UK) und bei -80 °C gelagert. Zur Kultivierung wurde der Columbia-Blut-Agar mit einer Kugel aus den Kryokulturen beimpft (Ghebremedhin 2009).

2.5.2 Kultivierung von *S. epidermidis* auf Kongorot-Agar

Zum Nachweis der Biofilmbildung wurden die *S. epidermidis*-Isolate auf Kongorot-Agar 36 Stunden bei 37°C angezüchtet. Schwarze Kolonien mit trockener Konsistenz waren ein Zeichen für Biofilmbildung, hingegen generierten Biofilm-negative Isolate pink/rote Kolonien (Freeman *et al.* 1989). Färbte sich zwar der Agar schwarz, jedoch zeigten die Kolonien eine eindeutig pink/rote Farbgebung, wurde auch dies als negative Biofilmbildung gewertet.

2.5.3 Phänotypische Untersuchung von *S. epidermidis*

Mit Hilfe der Systeme Phoenix™ von Becton Dickinson sowie VITEK®2 und ATB von bioMérieux wurden die *S. epidermidis*-Isolate phänotypisch identifiziert. Dabei wurden verschiedene Tests, wie z.B. Oxidations- und Wachstumstests, pH-Wert-Veränderungen und Enzymnachweis-Tests angewandt. Es existieren Datenbanken, die typische Reaktionen von bekannten Referenzstämmen enthalten (Layer *et al.* 2006, Ghebremedhin 2009).

Das ausgewählte Isolat wurde nach Anzüchtung auf Columbia-Blut-Agar im Gerät analysiert. Abhängig vom Ergebnis der biochemischen Reaktionen wird ein Profil erstellt und mit dem in der Datenbank befindlichen Bakteriendatensatz verglichen (Layer *et al.* 2006, Ghebremedhin 2009).

Es wurden die Identifizierungskarten GP für die Analyse im VITEK®2 (bioMérieux) und AST 580-Karten für die Resistenztestung verwendet. Nachdem die *S. epidermidis*-Isolate in 0,45 % Kochsalzlösung gelöst und eine Trübung entsprechend einem McFarland Standard von 0,5 hergestellt wurde, erfolgte die weitere Verarbeitung nach den Vorgaben des Herstellers (Arbeitsanleitung des Herstellers).

Im Phoenix™ von Becton Dickinson wurde das Testpanel des Typs PMIC/ID-60 für Staphylokokken zur Identifizierung und Resistenzbestimmung der *S. epidermidis*-Isolate verwendet. Verschiedene biochemische Reaktionen werden zur Analyse genutzt. Es wurde eine Bakterien suspension von *S. epidermidis* in ID-Broth (BD, Erembodegem, Belgien) mit einer Trübung entsprechend einem McFarland-Standard von 0,5 hergestellt und 25 µl davon in die

AST Broth überführt. Anschließend wurde 40 µl AST Indikator eingefüllt. Danach wurde die Suspension gut gemischt und in das Testpanel überführt. In die linke Kammer wurde die ID Broth und in die rechte Kammer die AST Broth eingefüllt und innerhalb 30 Minuten in das Gerät eingelesen (Arbeitsanleitung des Herstellers).

Nach 4 bis 8 Stunden zeigte das Phoenix™ (Software Version 1.06; BD Phoenix 100) das Ergebnis an, wenn das jeweilige Isolat mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 90 % identifiziert wurde und nur ein Ergebnis möglich ist (Ghebremedhin 2009).

Die Resistenzbestimmung wurde in Anlehnung an die Richtlinien von CLSI durchgeführt. Das Ergebnis lag nach 24 Stunden vor (CLSI 2005, Ghebremedhin 2009).

2.6 Genotypische Methoden

2.6.1 DNA-Isolierung von *S. epidermidis*

Zur Isolierung der DNA wurde das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Nachdem 3 Ösen von Kolonien in Eppendorf-Röhrchen überführt wurden, die 1 ml NaCl enthielten, wurden die Röhrchen 5 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgossen (Ghebremedhin 2009). Dem Bakterien-Pellet wurde 1 ml NaCl zugegeben. Danach wurde der Ansatz auf dem Vortexer gemischt und erneut 5 Minuten bei 12 000 U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ein drittes Mal zur Reinigung der Bakterien-Pellets wiederholt (Ghebremedhin 2009). Anschließend wurden 180 µl TE-Puffer und 18 µl Lysostaphin-Lösung (1 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde dann auf dem Vortexer gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 200 µl AL-Puffer und 20 µl Proteinase K dem Lysat zugefügt, gut gemischt und 30 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach folgte eine Inkubation von 15 Minuten bei 95°C. Nach diesen Schritten wurde der Ansatz durch Zugabe von 200 µl 96 %-Ethanol gefällt und auf dem Vortexer durchmischt. Anschließend wurde der Ansatz auf eine Säule pipettiert und 1 Minute bei 8 000 U/min zentrifugiert. Nachdem die Säule in ein neues Röhrchen gesetzt wurde, folgte die Zugabe von 500 µl AW1-Puffer und die Zentrifugation bei 8 000 U/min für 1 Minute. Die Säule wurde wiederum in ein neues Röhrchen umgesetzt, 500 µl AW2-Puffer zugegeben und 3 Minuten bei 14 000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein steriles Eppendorf-Röhrchen gesetzt und 100 µl AE-Puffer auf die Säule pipettiert. Im nächsten Schritt folgte die Zentrifugation bei 8000 U/min für 1 Minute. Die gereinigte DNA wurde danach bei -20°C aufbewahrt (Ghebremedhin 2009).

2.6.2 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Zur Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure wurde das NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) verwendet. Nukleinsäuren haben ihr Absorpti-

onsmaximum bei 260 nm, hingegen haben Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient aus $\text{Absorption}_{260\text{nm}}/\text{Absorption}_{280\text{nm}}$ gibt somit Auskunft über die Reinheit der Lösung. Bei Werten zwischen 1,8 und 2,0 kann von einer reinen Lösung von Nukleinsäure ausgegangen werden (Ghebremedhin 2009).

2.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ein Verfahren zur Verfielfältigung von DNA-Sequenzen ist die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Rassow *et al.* 2006, Ghebremedhin 2009). Dafür werden eine DNA-Matrize (template), eine thermostabile DNA-Polymerase, Oligodesoxyribonukleotide als Primer und dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) benötigt. Zunächst kommt es durch Erwärmung zur Auftrennung der DNA in die zwei Einzelstränge. Nachdem sich die Primer an die Einzelstränge angelagert haben (annealing), werden diese von der DNA-Polymerase verlängert. Schließlich erhält man eine Verfielfältigung des Fragmentes, welches von den Primern eingeschlossen wird (Rassow *et al.* 2006, Ghebremedhin 2009). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bestellt (Tabelle 2, 4, 6, 8) (Ghebremedhin 2009).

2.6.4 Herstellung des Agarosegels

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,5 g Agarosegel in 100 ml 1x TBE-Puffer aufgelöst. Anschließend wurde das Gemisch aufgeköcht und 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel hinzugefügt.

2.6.5 *agr*-Typisierung von *S. epidermidis*

Um die Isolate einer *agr*-Gruppe zuordnen zu können, wurde die PCR durchgeführt. Hierfür wurde das *Taq* DNA-Polymerase Kit von Qiagen verwendet (Ghebremedhin 2009).

Zunächst musste ein PCR-Ansatz hergestellt werden. Dafür wurden je 0,5 µl *forward*- und *reverse*-Primer mit 33,5 µl H₂O, 3 µl Desoxynukleotide (dNTPs), 2 µl MgCl₂, 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase, 5 µl 10 x Puffer und 3 µl *template*-DNA (bzw. 3 µl H₂O bei der Negativkontrolle) vermengt. Nach der PCR wurden die Produkte in einer Gel-Elektrophorese (1,5 %iges Gel) untersucht (Ghebremedhin 2009).

Der Amplifikationszyklus ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Primer zur *agr*-Typisierung

Primer	Produktgröße (bp)	Oligonukleotide (5'→3')	Referenz
<i>agrA</i>	1022	<i>agrA</i> F GCTGCAACCAAGAAACAACC <i>agrA</i> R CGTGTATTCATAATATGCTTCGATT	diese Arbeit
<i>agrB</i>	200	<i>agrB</i> F CCTTGGCTAGTGCTACATTT <i>agrB</i> R CCTCCTTAGGAAAAATACTGG	Li <i>et al.</i> 2004
<i>agrC</i>	458	<i>agrC</i> F TGTTTATGCAAGCCAAGCAC <i>agrC</i> R GGGCGAAAGCGGATAACAA	

Tabelle 3: Amplifikationszyklus von *agr*

	Amplifikationszyklus
<i>agrA, agrB, agrC</i>	5 min 94 °C; 35 Zyklen: 30 sec, 94 °C; 30 sec, 55 °C; 1 min, 72 °C; 7 min, 72 °C

2.6.6 Untersuchung auf IS256

Das Vorhandensein des Insertionselement IS256 wurde mit Hilfe des *Taq*-DNA-Polymerase Kit von Qiagen überprüft (Ghebremedhin 2009).

Zunächst musste ein PCR-Ansatz hergestellt werden. Dafür wurden je 0,5 µl *forward*- und *reverse*-Primer mit 35,5 µl H₂O, 3 µl Desoxynukleotide (dNTPs), 2 µl MgCl₂, 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase, 5 µl 10 x Puffer und 3 µl *template*-DNA (bzw. 3 µl H₂O bei der Negativkontrolle) vermischt. Nach der PCR wurden die Produkte in einer Gel-Elektrophorese (1,5 %iges Gel) untersucht (Ghebremedhin 2009).

Der Amplifikationszyklus ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 4: Primer zur Identifikation von IS256

Primer	Produktgröße (bp)	Oligonukleotide (5'→3')	Referenz
IS256	1102	IS256 F TGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGC IS256 R ATGTAGGTCCATAAGAACGGC	Ziebuhr <i>et al.</i> 1999

Tabelle 5: Amplifikationszyklus von IS256

	Amplifikationszyklus
IS256	5 min 94 °C; 25 Zyklen: 30 sec, 94 °C; 30 sec, 52 °C; 1 min, 72 °C; 7 min, 72 °C

2.6.7 Untersuchung auf den *ica*-Genkomplex

Das *polysaccharide intercellular Adhesin* (PIA) wird vom *ica*-Operon kodiert (Heilmann *et al.* 1996, Ziebuhr *et al.* 1997). Das Vorhandensein des *icaA/D*-Gens wurde mit Hilfe des *Taq*-DNA-Polymerase Kit von Qiagen überprüft.

Zunächst musste ein PCR-Ansatz hergestellt werden. Dafür wurden je 0,5 µl *forward*- und *reverse*-Primer mit 34,5 µl H₂O, 3 µl Desoxynukleotide (dNTPs), 2 µl MgCl₂, 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase, 5 µl 10 x Puffer und 3 µl *template*-DNA (bzw. 3 µl H₂O bei der Negativkontrolle) vermengt. Nach der PCR wurden die Produkte in einer Gel-Elektrophorese (1,5 %iges Gel) analysiert (Ghebremedhin 2009).

Der Amplifikationszyklus ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 6: Primer zur *icaA/D*-Typisierung

Primer	Produktgröße (bp)	Oligonukleotide (5'→3')	Referenz
<i>icaA</i>	188	<i>icaA</i> F TCTCTTGCAGGAGCAATCAA <i>icaA</i> R TCAGGCACTAACATCCAGCA	Aricola <i>et al.</i> 2001
<i>icaD</i>	198	<i>icaD</i> F ATGGTCAAGCCCAGACAGAG <i>icaD</i> R CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	

Tabelle 7: Amplifikationszyklus von *icaA/D*

	Amplifikationszyklus
<i>icaA</i> , <i>icaD</i>	5 min 94 °C; 35 Zyklen: 30 sec, 94 °C; 45 sec, 55,5 °C; 1 min, 72 °C; 7 min, 72 °C

2.6.8 Untersuchung auf das Vorhandensein des SCC*mec*-Komplexes

Die Oxacillin-Resistenz bei *S. epidermidis* wird durch ein Penicillin-bindendes Protein vermittelt, welches vom *mecA*-Gen kodiert wird (Chambers 1988, Mombach Pinheiro Machado *et al.* 2007). Das *mecA*-Gen ist Teil des sogenannten staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) Systems (Ito *et al.* 2003).

Um die Isolate den unterschiedlichen SCC*mec*-Typen zuordnen zu können wurde die PCR durchgeführt. Hierfür wurde das *Taq* DNA-Polymerase Kit von Qiagen verwendet (Ghebremedhin 2009).

Zunächst musste ein PCR-Ansatz hergestellt werden. Dafür wurden die *forward*- und *reverse*-Primer (je 0,096 µl (CIF F2 und R2, MECI P2 und P3, RIF5F10 und R13, pUB110 R1, pT181 R1) bzw. 0,192 µl (DCS F2 und R1, MECAP4 und P7, IS431 P4) bzw. 0,048 µl (KDP F1 und R1, RIF4 F3 und R9)) mit 31,83 µl H₂O, 4 µl Desoxynukleotide (dNTPs), 2 µl MgCl₂,

0,25 µl *Taq*-DNA-Polymerase, 5 µl 10 x Puffer und 3 µl *template*-DNA (bzw. 3 µl H₂O bei der Negativkontrolle) vermengt. Nach der PCR wurden die Produkte in einer Gel-Elektrophorese (1,5 %iges Gel) analysiert (Ghebremedhin 2009).

Tabelle 8: Primer zur SCC*mec*-Typisierung

Primer	Produktgröße (bp)	Oligonukleotide (5'→3')	Referenz
CIF F2 CIF R2	495	CIF F2 TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG CIF R2 ATTTACCACAAGGACTACCAGC	Oliveira <i>et al.</i> 2002
KDP F1 KDP R1	284	KDP F1 AATCATCTGCCATTGGTGATGC KDP R1 CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	
<i>MECI</i> P2 <i>MECI</i> P3	209	<i>MECI</i> P2 ATCAAGACTTGCATTCAGGC <i>MECI</i> P3 GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	
DCS F2 DCS R1	342	DCS F2 CATCCTATGATAGCTTGGTC DCS R1 CTAAATCATAGCCAGACCG	
RIF4 F3 RIF4 R9	243	RIF4 F3 GTGATTGTTCGAGATATGTGG RIF4 R9 CGCTTTATCTGTATCTATCGC	
RIF5 F10 RIF5 R13	414	RIF5 F10 TTCTTAAGTACACGCTGAATGC RIF5 R13 GTCACAGTAATTCATCAATGC	
IS431 P4 pUB110 R1	381	IS431 P4 CAGGTCTCTCTTCAGATCTACG pUB110 R1 GAGCCATAACACCAATGCC	
IS431 P4 pT181 R1	303	IS431 P4 CAGGTCTCTCTTCAGATCTACG pT181 R1 GAAGATGGGGAAAGCTTCAC	
<i>MECA</i> P4 <i>MECA</i> P7	162	<i>MECA</i> P4 TCCAGATTACAACCTTCACCAGG <i>MECA</i> P7 CCACTTCATATCTTGTAACG	

Je nach Größe der Fragmente wurden die Proben den verschiedenen SCC*mec* Typen zugeordnet (Tabelle 9). Wenn die Signale keinem SCC*mec*-Typen zugeordnet werden konnten, aber der *mecA*-Nachweis positiv war, so wurde das Isolat als nicht typisierbar eingeordnet.

Tabelle 9: Zuordnung zum SCC*mec*-Typ

Fragmentgröße (bp)	SCC <i>mec</i> -Typ
495	I
284	II
209	II, III
342	I, II, IV
243	III
414	III
381	Ia
303	III
162	interne Kontrolle

Der Amplifikationszyklus ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Amplifikationszyklus von SCC*mec*

	Amplifikationszyklus
CIF F2,CIF R2, KDP F1,KDP R1,MECI P2,MECI P3,DCS F2,DCS R1,RIF4 F3,RIF4 R9,RIF5 F10,RIF5 R13,IS431 P4, pUB110 R1, pT181 R1,MECA P4,MECA P7	4 min 94 °C; 30 Zyklen: 30 sec, 94 °C; 30 sec, 53 °C; 1 min, 72 °C; 4 min, 72 °C

2.6.9 Multilocus-Sequenzanalyse (MLST)

Multilocus Sequence Typing (MLST) ist ein Verfahren zur molekularen Typisierung von Bakterienstämme durch die Sequenzanalyse von sieben sogenannten Haushaltsgene (*hou-*

sekeeping genes) (<http://sepidermidis.mlst.net/>). Durch diese Vorgehensweise konnten neue Erkenntnisse über die Epidemiologie verschiedener Bakterienstämme gemacht werden (Ghebremedhin 2009).

Mit Hilfe des TaKaRa *ExTaq*-DNA-Polymerase Kits von TaKaRa wurde die PCR durchgeführt. 1x *Ex Taq* Puffer, 800 µM dNTPs, 8 mM MgCl₂, 1,25 U *Taq*-DNA-Polymerase, 1,0 M Oligonukleotid und HPLC-Wasser wurden zu einem Volumen von 50 µl zusammengefügt (Ghebremedhin 2009).

Die für die Multilocus-Sequenzanalyse eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 11 angegeben und der Amplifikationszyklus ist in Tabelle 12 aufgeführt. Im Folgenden wurden die PCR-Fragmente mit einer Gelelektrophorese untersucht und teilweise anschließend mittels Sequenzierung analysiert.

Tabelle 11: Oligonukleotide zur Genotypisierung von *S. epidermidis*

Gen	Amplifikatgröße (bp)	Oligonukleotide (5'→3')	Referenz
Multisequenz-Analyse			
<i>arcC</i>	465	<i>arcC</i> -F TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG <i>arcC</i> -R TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG	Wisplinghoff <i>et al.</i> 2003 http://sepidermidis.mlst.net/
<i>aroE</i>	420	<i>aroE</i> -F CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC <i>aroE</i> -R CAAGCGAAATCTGTTGGGG	
<i>gtr</i>	438	<i>gtr</i> -F CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT <i>gtr</i> -R GTGATTAAAGGTATTGATTTGAAT	
<i>mutS</i>	412	<i>mutS</i> -F3 GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA <i>mutS</i> -R3 GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT	
<i>pyrR</i>	428	<i>pyr</i> -F2 GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT <i>pyr</i> -R4 GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA	
<i>tpiA</i>	424	<i>tpi</i> -F2 ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC <i>tpi</i> -R2 TTAATGATGCGCCACCTACA	
<i>yqiL</i>	416	<i>yqiL</i> -F2 CACGCATAGTATTAGCTGAAG <i>yqiL</i> -R2 CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA	

Tabelle 12: Amplifikationszyklus der *housekeeping genes*

	Amplifikationszyklus	Referenz
<i>arcC</i> , <i>aroE</i> , <i>gtr</i> , <i>mutS</i> , <i>pyrR</i> , <i>tpiA</i> , <i>yqiL</i>	3 min 95 °C; 34 Zyklen: 30 sec, 95 °C; 1 min, 50 °C; 1 min, 72 °C; am Ende 10 min, 72 °C	http://sepidermidis.mlst.net/

2.6.9.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Das Aufreinigungskit QIAquick von Qiagen wurde verwendet um die überschüssigen Primer, Puffersalze, dNTPs und Taq-Polymerase zu beseitigen und die weitere Analyse der PCR-Produkte zu ermöglichen. Dafür wurden 5 Anteile PB-Puffer zu 1 Anteil der Probe hinzugegeben und nach Auftragen auf die Säule für 1 Minute bei 13 000 U/min zentrifugiert. Nachdem der Mischung zum Waschen der Membran 750 µl PE-Puffer zugefügt wurde, folgte die Zentrifugation für 1 Minute bei 13 000 U/min und danach nochmals eine Zentrifugation für 1 Minute bei 13 000 U/min zum Trocknen der Membran (Ghebremedhin 2009).

Anschließend wurde die Säule in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, 50 µl EB-Puffer auf die QIAquick-Membran gegeben und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz 1 Minute bei 13 000 U/min zentrifugiert (Ghebremedhin 2009).

2.6.9.2 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung basiert auf einer Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977).

Zunächst muss der zu sequenzierende Abschnitt vervielfältigt und gereinigt werden (2.6.9. bis 2.6.10.). Im Reaktionsansatz befinden sich dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) und ddNTPs (Didesoxyribonukleosidtriphosphate). Nach der Anlagerung der Primer verlängert die Taq-Polymerase diese und fügt nach dem Zufallsprinzip dNTPs und ddNTPs ein. Sobald es zum Einbau von ddNTPs kommt, führt dies zum Kettenabbruch. Dies wird häufig wiederholt, sodass schließlich Fragmente unterschiedlichster Länge entstehen (Sanger *et al.* 1977, Rassow *et al.* 2006, Ghebremedhin 2009). Jeder Reaktionsansatz bestand aus 140 ng Amplifikat, 1 µl des jeweiligen Primers und 9 µl des BigDye Terminators. Mit H₂O wurde auf 20 µl aufgefüllt. Die Auftrennung in die Einzelstränge fand bei 96 °C (30 sec) statt, die Anlagerung der Primer bei 54-60°C (10 sec) und die Verlängerung bei 60 °C (4 Minuten). Dieser Zyklus wurde 29-mal wiederholt. Dabei wurden sowohl markierte ddNTPs als auch unmarkierte dNTPs eingebaut, wobei die ddNTPs zum Kettenabbruch führten. Anschließend wurde der Ansatz von überschüssigen Produkten mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Applied Biosystems) gereinigt (Ghebremedhin 2009).

Die Sequenzierung in der vorliegenden Arbeit wurde mittels fluoreszenz-markierten Nucleotiden in einem Kapillar-Sequenzierer durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden 5 µl des aufgereinigten Produktes und 15 µl HiDi in einer Mikrotiterplatte gemischt. Die Kapillarelektrophorese der markierten Produkte wurde mit Hilfe des ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Signale wurden vom Analyseprogramm (ABI Prism Sequencing Analysis 3.0 (PE Biosystems)) berechnet, sodass diese schließlich in vierfarbigen Elektropherogrammen gezeigt werden (Ghebremedhin 2009). Die Sequenzdateien wur-

den mit Hilfe einer Software (Sequencher) analysiert (Middendorf *et al.* 2001, Madigan *et al.* 2001, Ghebremedhin 2009).

2.6.9.3 Auswertung der klonalen Linien von *S. epidermidis* (MLST)

Die Analyse der Gensequenzen fand mit Hilfe der *ABI Prism Sequencing Analysis 3.0* Analysesoftware (Applied Biosystems) und der *Assembler* Software (Applied Biosystems) statt. Um einen Verwandtschaftsgrad zu ermitteln, werden Sequenzvergleiche (*Alignments*) durchgeführt, wobei Sequenzen gegeneinander verschoben werden, damit eine große Übereinstimmung in der Basenfolge auftritt. Die Alignments wurden mit *BioEdit* Version 7.0.1 (Hall 1999) bzw. *DNASIS[®]MAX* Version 2.0.5 (Hitachi Software Engineering, Japan) erstellt (Ghebremedhin 2009).

Für jede Probe wurden die Allele der Haushaltsgene bestimmt. Den jeweiligen Allelen wurde eine Zahl zugeordnet, sodass man ein Allelprofil erhalten hat (Enright *et al.* 2002, Ghebremedhin 2009). Anschließend kann ein Dendrogramm erstellt werden, welches den Verwandtschaftsgrad der unterschiedlichen Sequenztypen darstellt (Enright *et al.* 2002, Ghebremedhin 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Allelprofile der sieben Haushaltsgene (housekeeping genes) Carbamatkinase (*arcC*), Shikimat-Dehydrogenase (*aroE*), ABC Transporter (*gtr*), DNA-Mismatch Reparatur-Protein (*mutS*), Pyrimidin operon Regulationsprotein (*pyrR*), Triosephosphatisomerase (*tpi*) und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (*yqiL*) analysiert. Die untersuchten *S. epidermidis*-Isolate konnten am Ende mittels Server (<http://sepidermidis.mlst.net/>) einem Sequenztyp zugeordnet werden (Ghebremedhin *et al.* 2009, Ghebremedhin 2009).

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl der Isolate

Aus den eingesandten Materialien unterschiedlicher Patienten am Universitätsklinikum wurden 200 *S. epidermidis*-Isolate angezüchtet. Bei rund einem Drittel der Isolate handelte es sich um Blutkulturen, während sich der übrige Anteil aus Material von Katheterspitzen, Implantaten und Gewebeproben zusammensetzte (Abbildung 5). Die Katheterspitzen wurden nochmals unterteilt in zentrale Venenkatheter (ZVK) und Drainagen bzw. andere Katheter. Unter dem Oberbegriff Gewebe wurde Untersuchungsmaterial von Punktionen, Abszessen und intraoperativem Material zusammengefasst. Da einige Isolate von Totalendoprothesen, Herzschrittmachermaterial oder Intrauterinpressaren (IUD) stammten, wurde eine zusätzliche Gruppe unter dem Oberbegriff Implantate gebildet.

Die Einsendungen kamen aus Kliniken der medizinischen Fakultät der Universitätsklinik. Es wurde keine besondere Einteilung der Patienten vorgenommen, lediglich das Einsendungsmaterial wurde zur besseren Vergleichbarkeit den genannten Gruppen zugeordnet (Abbildung 5).

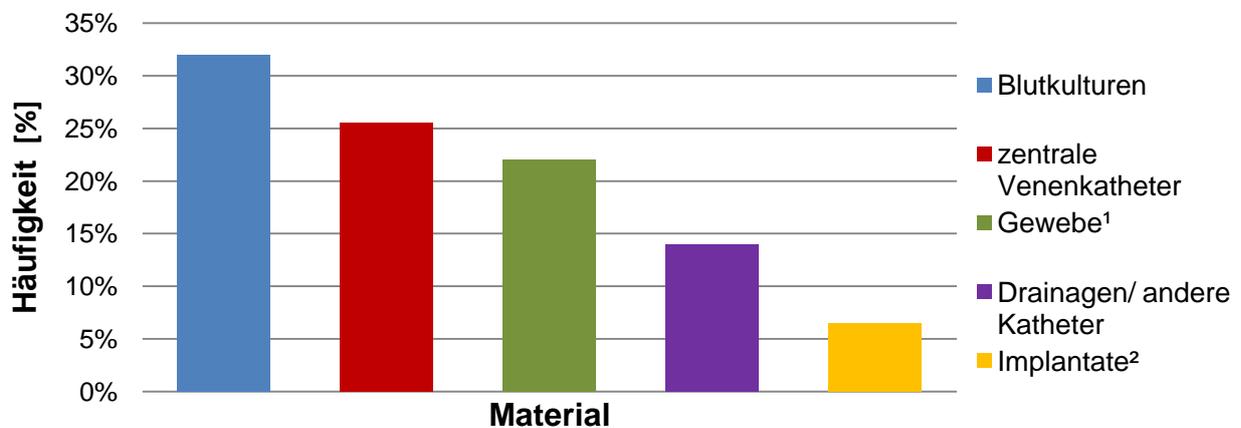


Abbildung 5: Art der Materialien,
aus denen die *S. epidermidis*-Isolate gewonnen wurden ($n=200$)

¹ intraoperatives Material, Punktatmaterial, Abszessmaterial

² TEP Material, Schrittmachermaterial, IUD (*intrauterine device*)

3.2 Antibiotikaresistenz der *S. epidermidis*-Isolate

Das Resistenzverhalten wurde mittels VITEK®2 und Phoenix™ untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass über 91,5 % der Isolate resistent gegenüber Penicillin waren und 76 % resistent gegen Oxacillin. Hohe Resistenzraten konnten auch bei Erythromycin (70,5 %), bei Clindamycin (67,5 %) und bei Ciprofloxacin (57 %) festgestellt werden. Bei der Testung gegen Gentamicin erwiesen sich 46 % als resistent und 25 % der Isolate zeigten eine Resistenz gegen Cotrimoxazol. Alle 200 Isolate waren gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid sensibel.

Weiterhin wurden Resistenzprofile erstellt um zu untersuchen, ob es multiresistente Isolate gab (Abbildung 6). Gegenüber Penicillin waren 183 Isolate resistent. Bei 152 Isolaten konnte eine Resistenz gegenüber Penicillin und zusätzlich gegen Oxacillin nachgewiesen werden. Das Resistenzprofil PEN-OXA-CIP wurde bei 103 Isolaten detektiert. Zusätzlich resistent gegen Gentamicin waren 71 Isolate. Wurde die Erythromycin-Resistenz in das Resistenzprofil einbezogen, so gehörten zu diesem Profil insgesamt 62 Isolate.

Ein multiresistentes Profil wurde 41 Isolaten zugeordnet, die *icaA/D*-positiven waren sowie resistent gegen Penicillin, Oxacillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Erythromycin und Clindamycin.

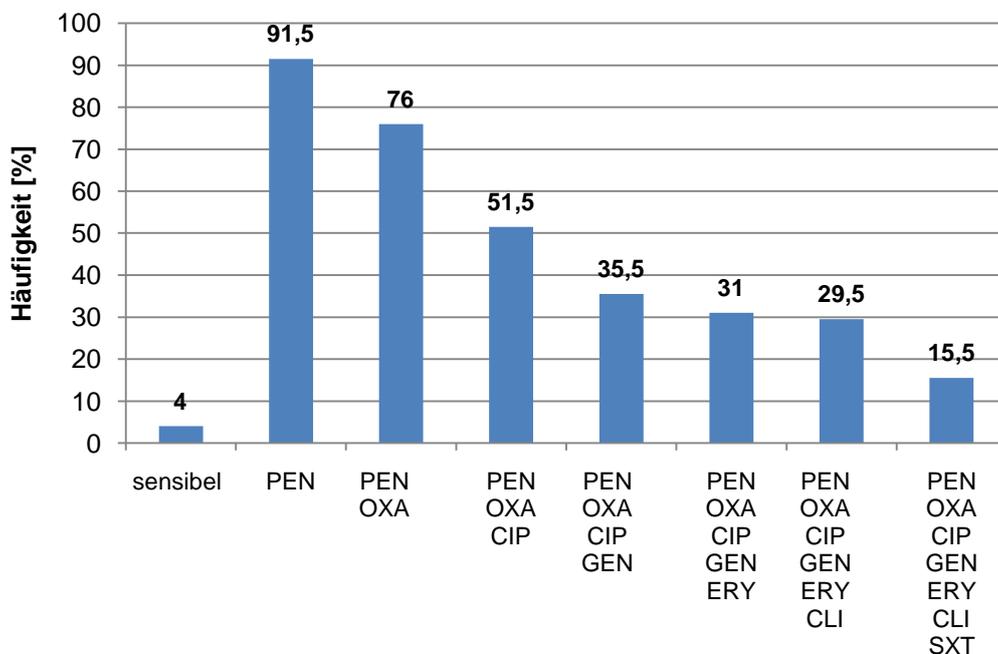


Abbildung 6: Häufigkeit von ausgewählten Resistenzprofilen, ($n=200$);

(PEN: Penicillin; OXA: Oxacillin; CIP: Ciprofloxacin;

GEN: Gentamicin; ERY: Erythromycin; CLI: Clindamycin; SXT: Cotrimoxazol)

3.3 Nachweis der Biofilmbildung

Die Kultivierung auf Kongorot-Agar ist eine einfach durchzuführende Methode, um die Biofilmbildung phänotypisch nachzuweisen. Ist ein Isolat in der Lage, einen Biofilm zu bilden, sind schwarze Kolonien mit einer eher trockenen Konsistenz sichtbar (s. 2.5.2., Freeman *et al.* 1989).

Pink/rote Kolonien hingegen zeigen an, dass die Isolate phänotypisch keinen Biofilm bilden können (Abbildung 7).

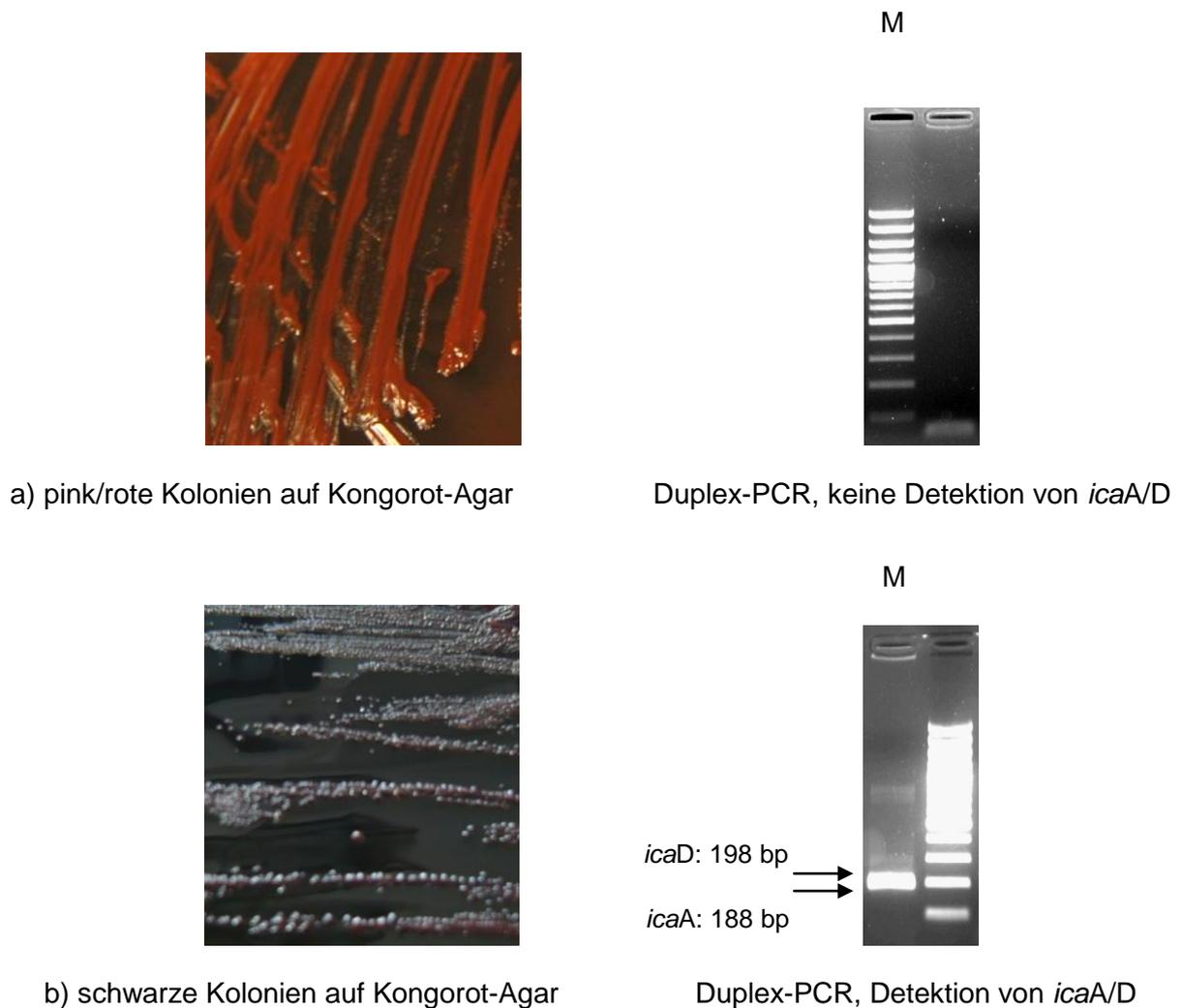


Abbildung 7: Kultivierung auf Kongorot-Agar mit
a) negativer und b) positiver Biofilmbildung; (M: Marker)

Bei der Untersuchung aller Isolate war zu verzeichnen, dass insgesamt 32 % der Isolate schwarze Kolonien auf Kongorot-Agar bildeten und somit phänotypisch in der Lage sind, einen Biofilm zu bilden.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Materialart mit der Häufigkeit der Biofilmbildung korreliert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 8 dargestellt.

Über die Hälfte der *S. epidermidis*-Isolate aus den unterschiedlichen Materialarten haben sich auf Kongorot-Agar als pink/rote Kolonien dargestellt. Dies ist ein Hinweis, dass diese zur phänotypischen Biofilmbildung nicht befähigt sind.

S. epidermidis-Isolate, die von Implantaten angezchtet wurden, bildeten am häufigsten einen Biofilm (46,2%). Bei den Isolaten aus Drainmaterial und Gewebeproben bildeten etwas mehr als ein Drittel der Isolate einen Biofilm.

S. epidermidis-Isolate aus Blutkulturen und Katheterspitzen (ZVK) hingegen bildeten in fast 75 % der Fälle keinen Biofilm auf Kongorot-Agar.

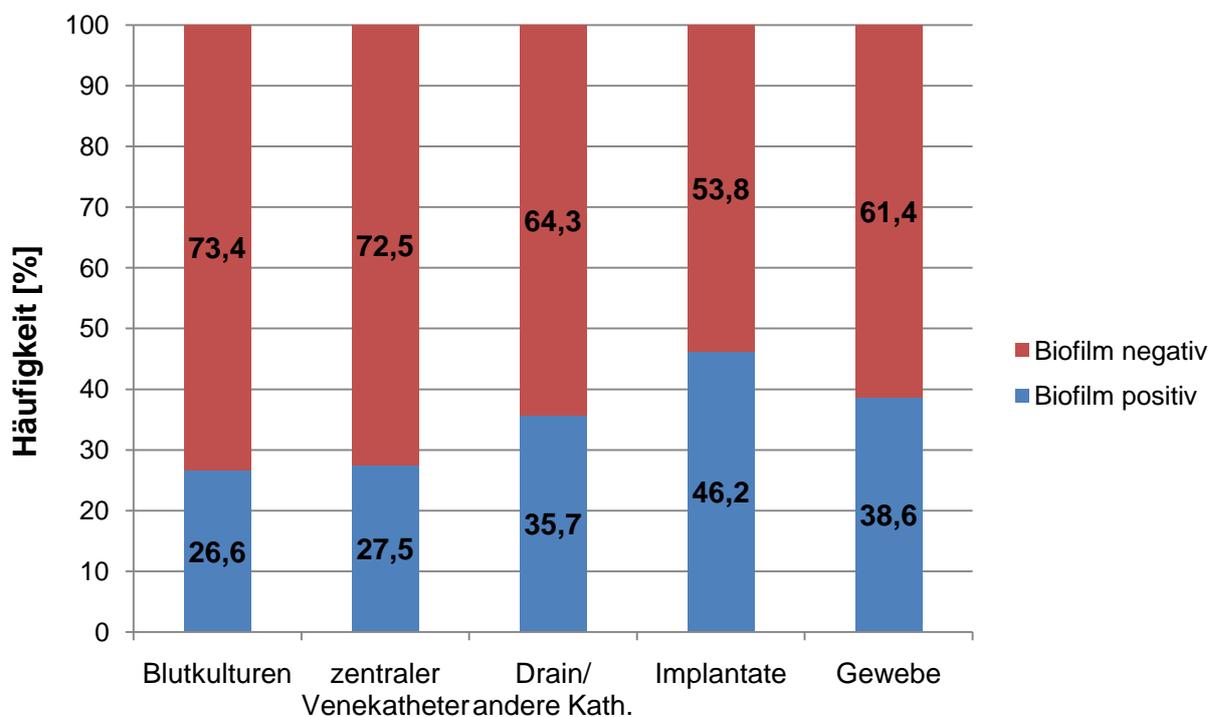


Abbildung 8: Häufigkeit der Biofilmbildung bei den verschiedenen Materialarten ($n=200$)

3.4 Genotypische Untersuchungen

3.4.1 Nachweis der *ica*-Gene

Phänotypisch Biofilm-negative *S. epidermidis*-Isolate waren teilweise *icaA/D*-positiv und erfüllten damit die genotypische Bedingung für die Biofilmbildung.

In den Kapiteln 1.2 und 1.3 wurde erläutert, dass eine wesentliche Voraussetzung zur Akkumulation das *polysaccharide intercellular Adhesin* (PIA) ist, welches wiederum vom *ica*-Operon kodiert wird. Aufgrund dessen sollte die genotypische Fähigkeit zur Biofilmbildung durch eine PCR mit Untersuchung des *ica*-Genkomplexes nachgewiesen werden (s. 2.6.7.)

Die genotypische Untersuchung erfolgte mittels Duplex-PCR (Abbildung 9).

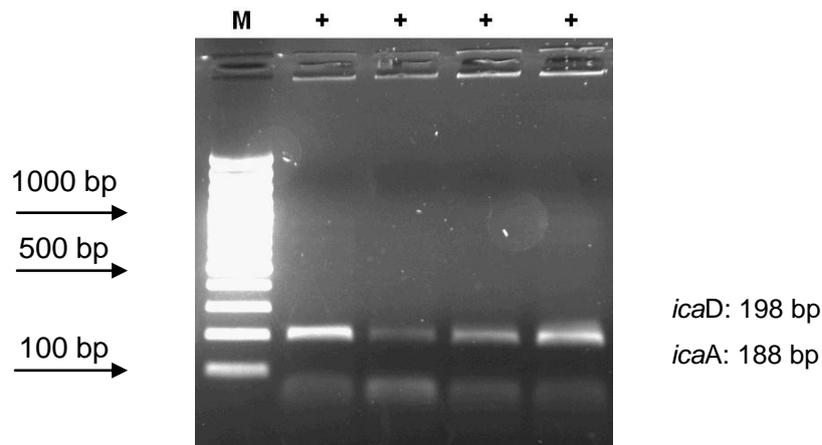


Abbildung 9: Duplex-PCR zur Untersuchung auf den *ica*-Genkomplex;
(M: Marker; +: *icaA/D*-positiv)

Betrachtete man die Biofilmbildung und die *icaA/D*-Gene in einem Zusammenhang, so waren 61 *S. epidermidis*-Isolate *icaA/D*-positiv und zugleich phänotypische Biofilmbildner. Drei *icaA/D*-negative *S. epidermidis*-Isolate waren trotzdem in der Lage, phänotypisch Biofilm zu bilden (Tabelle 13).

Insgesamt 136 Isolate bildeten auf Kongorot-Agar keinen Biofilm. Davon waren 63 *icaA/D*-positiv und 73 *icaA/D*-negativ.

Tabelle 13: Untersuchung der Biofilmbildung und des *ica*-Genkomplexes.

<i>icaA/D</i>	Biofilm		Summe
	positiv	negativ	
positiv	61	63	124
negativ	3	73	76
Summe	64	136	200

Abbildung 10 veranschaulicht die phänotypische Biofilmbildung und das Vorhandensein der *ica*-Gene.

Dafür wurde zunächst der *ica*-Genkomplex untersucht um danach in zwei Gruppen (*icaA/D*-positiv und *icaA/D*-negativ) die Biofilmbildung zu beurteilen. Von 124 *icaA/D*-positiven Isolaten zeigten sich nur 49 % als in vitro Biofilm-bildend.

Bei 76 Isolaten konnte kein *ica*-Genkomplex nachgewiesen werden. Bei der Kultivierung auf Kongorot-Agar fiel auf, dass von diesen *icaA/D*-negativen Isolaten 96,1 % in vitro keinen Biofilm bilden konnten, wohingegen 3 Isolate (3,9 %) einen Biofilm auf Kongorot-Agar bildeten.

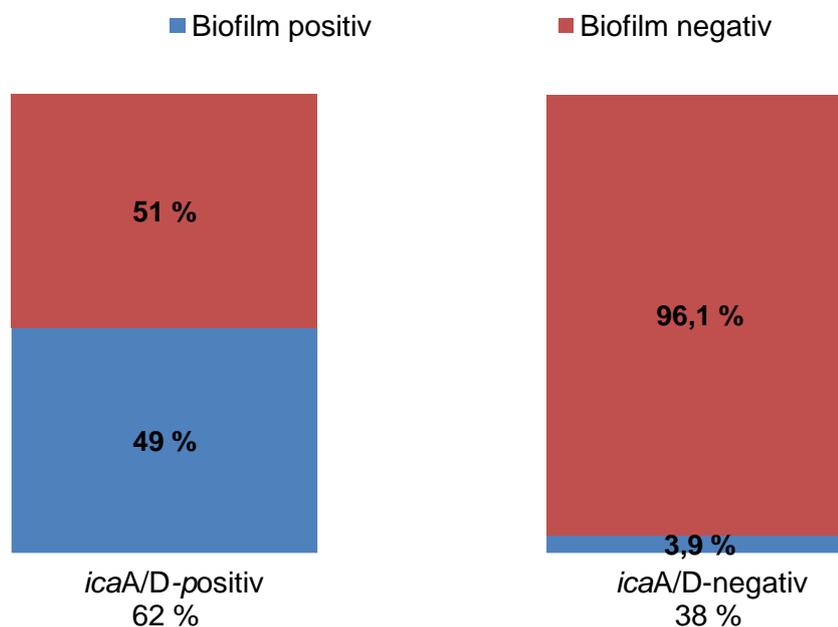


Abbildung 10: Biofilmbildung in Abhängigkeit vom Vorhandensein des *ica*-Genkomplexes ($n=200$)

3.4.2 Das Insertionselement IS256

Die 200 *S. epidermidis*-Isolate wurden auf das Vorhandensein des Insertionselementes IS256 untersucht (Abbildung 11).

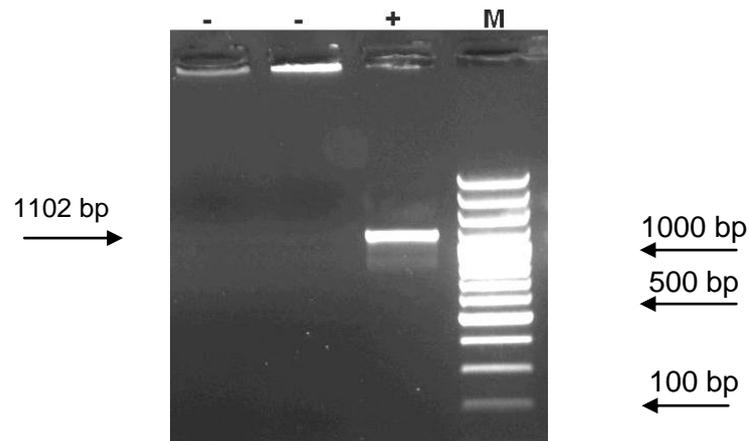


Abbildung 11: PCR zur Untersuchung der *S. epidermidis*-Isolate auf das Insertionselement IS256; (M: Marker; +: IS256 positiv; -: IS256 negativ)

In der PCR-Untersuchung waren 105 *S. epidermidis*-Isolate (52,5 %) IS256-positiv (Abbildung 12a).

Betrachtete man jedoch nur die multiresistenten Isolate, konnte IS256 insgesamt bei 95,1 % detektiert werden (Abbildung 12b).

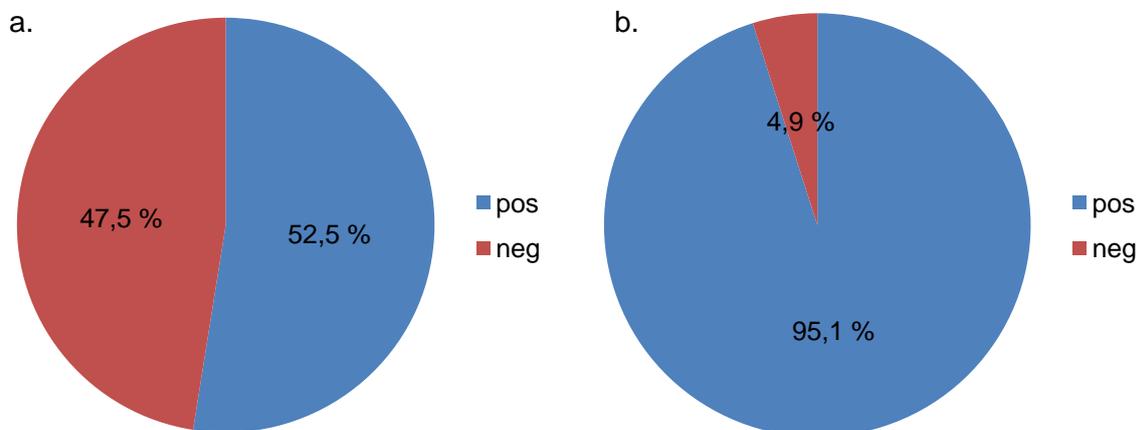


Abbildung 12: Nachweis des Insertionselementes IS256, a: alle Isolate ($n=200$)
b: multiresistente Isolate ($n=41$); (pos: IS256 positiv; neg: IS256 negativ)

Untersucht man die phänotypisch Biofilm-negativen Isolate, die *icaA/D*-positiv waren, auf das Vorhandensein des Insertionselementes IS256, so stellte man fest, dass 63,5 % dieser Isolate das Element besitzen und bei 36,5 % kein Insertionselement IS256 nachgewiesen werden konnte.

3.4.3 *agr*-Gruppenspezifität

Das *accessory gene regulator-(agr)* System ist sowohl in pathogenen als auch in nicht pathogenen *S. epidermidis*-Isolaten vorhanden. Darum sollte das *agr*-System nicht nur als Regulator von Virulenzfaktoren betrachtet werden, sondern vielmehr als *Quorum-sensing*-System, welches u.a. Virulenzfaktoren wachstumsabhängig reguliert (Otto 2001, 2004). Die Isolate wurden mittels Multiplex-PCR auf ihre *agr*-Gruppe untersucht (Abbildung 13).

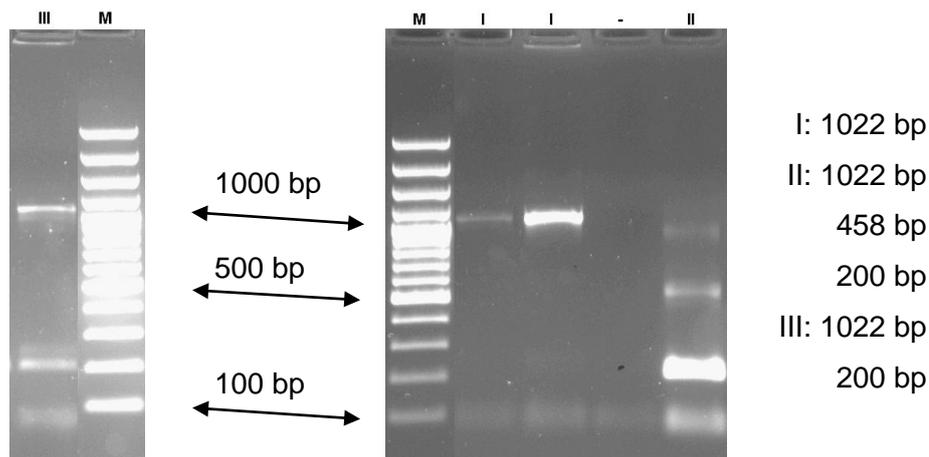


Abbildung 13: Multiplex-PCR zur Untersuchung der *agr*-Gruppen;
 (M: Marker; I: *agr*-Gruppe I; II: *agr*-Gruppe II; III: *agr*-Gruppe III)

Dabei wurden 39 *S. epidermidis*-Isolate der *agr*-Gruppe I zugeordnet und 66 Isolate der *agr*-Gruppe II. Bei 70 Isolaten konnte *agr*-Gruppe III nachgewiesen werden. Die übrigen Isolate erwiesen sich als *agr* negativ. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

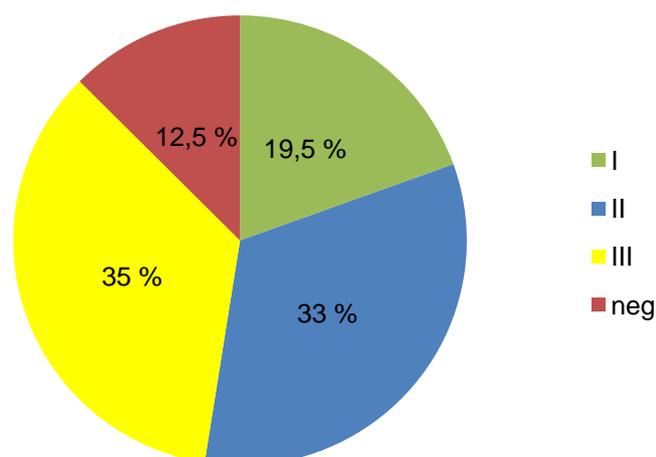


Abbildung 14: *agr*-Gruppenspezifität der *S. epidermidis*-Isolate ($n=200$);
 (I: *agr*-Gruppe I; II: *agr*-Gruppe II; III: *agr*-Gruppe III; neg: *agr*-negativ)

Wie in Abbildung 14 ersichtlich, lässt sich zusammenfassen, dass *agr*-Gruppe II und III am häufigsten vertreten waren, während *agr*-Gruppe I seltener detektiert wurde.

3.4.4 SCC*mec*-Typisierung

In Kapitel 1.6 wurde erläutert, dass der SCC*mec*-Komplex die Resistenzgene gegen einige Antibiotika, darunter auch gegen Oxacillin, aufweisen kann. Der SCC*mec*-Typ wurde mittels Multiplex-PCR bestimmt (Abbildung 15).

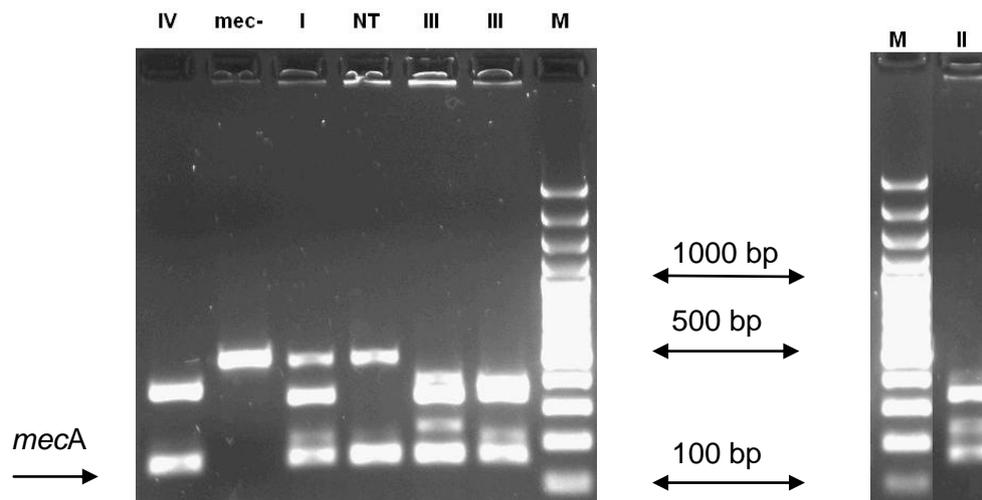


Abbildung 15: Multiplex-PCR zur Bestimmung des SCC*mec*-Typs;
 (I: SCC*mec*-Typ I; II: SCC*mec*-Typ II; III: SCC*mec*-Typ III; IV: SCC*mec*-Typ IV;
mec -: SCC*mec* negativ, NT: nicht typisierbar M: Marker)

Der SCC*mec*-Typ I wurde mit 39,5 % ($n=79$ Isolate) am häufigsten nachgewiesen. Des Weiteren wurde Typ II bei 25 *S. epidermidis*-Isolaten (12,5 %) sowie Typ III bei insgesamt 14 *S. epidermidis*-Isolaten (7 %) detektiert. SCC*mec*-Typ IV wurde bei 10 *S. epidermidis*-Isolaten (5 %) nachgewiesen. Einige Isolate ($n=25$ Isolate; 12,5 %) besaßen zwar das *mecA*-Gen, konnten jedoch keinem SCC*mec*-Typen zugeordnet werden.

Von den 200 *S. epidermidis*-Isolate waren 23,5 % ($n=47$ Isolate) genotypisch *mecA*-negativ. Betrachtet man das Resistenzprofil dieser Isolate, so fällt auf, dass 42 der 47 Isolate sensibel für Oxacillin getestet wurden und 5 Isolate resistent.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

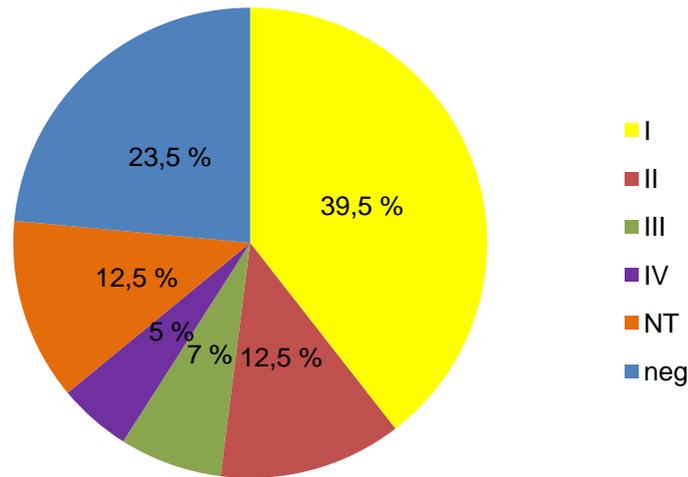


Abbildung 16: Häufigkeiten der SCCmec-Typen ($n=200$); (I: SCCmec-Typ I; II: SCCmec-Typ II; III: SCCmec-Typ III; IV: SCCmec-Typ IV; NT: nicht typisierbar, neg: SCCmec negativ)

3.4.5 SCCmec-Typen im Zusammenhang mit der Antibiotikaresistenz

Um den Zusammenhang zwischen SCCmec-Typen und der Antibiotikaresistenz näher zu untersuchen, wurde die Korrelation zwischen SCCmec-Typ und der Antibiotikaresistenz gegenüber Nicht-Betalaktam-Antibiotika untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

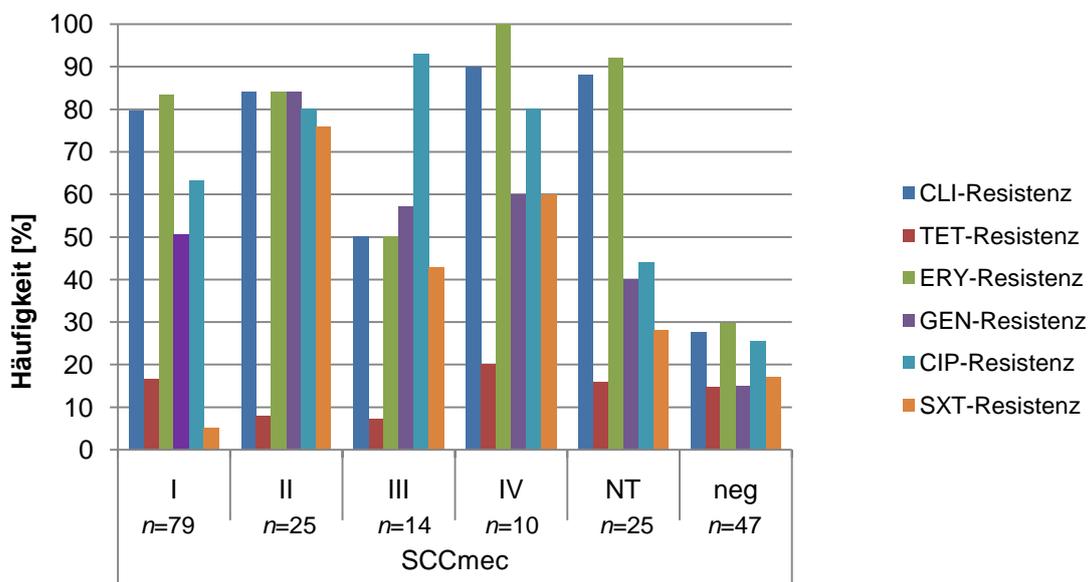


Abbildung 17: Korrelation der SCCmec-Typen mit Antibiotikaresistenz; die Anzahl der Isolate ist unter den jeweiligen Typen angegeben; (I: SCCmec-Typ I; II: SCCmec-Typ II; III: SCCmec-Typ III; IV: SCCmec-Typ IV; NT: nicht typisierbar, neg: SCCmec negativ, CLI: Clindamycin; TET: Tetrazyklin; ERY: Erythromycin; GEN: Gentamicin; CIP: Ciprofloxacin; SXT: Cotrimoxazol)

Die SCC*mec*-Typen und die nicht typisierbaren Isolate wiesen höhere Anteile an resistenten Isolaten gegen ausgewählten Antibiotika (Clindamycin, Erythromycin, Gentamicin, Ciprofloxacin) auf, als die Isolate ohne *mecA*-Gen. Weiterhin zeigte SCC*mec*-Typ II eine außerordentlich hohe Resistenzrate gegenüber allen Antibiotika mit Ausnahme von Tetrazyklin. Zudem bestand bei vielen SCC*mec*-Typen und den nicht typisierbaren Isolaten eine hohe Resistenzrate gegenüber Clindamycin und Erythromycin und häufig auch gegenüber Ciprofloxacin. Eine Ausnahme davon bildet SCC*mec*-Typ III, da bei diesen Isolaten eine vergleichsweise niedrige Resistenzrate gegenüber Clindamycin und Erythromycin und eine hohe Resistenzrate gegenüber Ciprofloxacin auffiel. Ein relevanter Anteil der *S. epidermidis*-Isolate trug SCC*mec*-Typ IV und war mit hohen Resistenzraten gegenüber Erythromycin, Clindamycin und Ciprofloxacin und einer niedrigeren Resistenzrate gegenüber Tetrazyklin, Gentamicin und Cotrimoxazol versehen. Jedoch ist die Resistenz dieser Isolate gegenüber Tetrazyklin und Cotrimoxazol etwas ausgeprägter als die der meisten Isolate mit anderen SCC*mec*-Typen.

3.4.6 Korrelation zwischen den *agr*-Gruppen und den SCC*mec*-Typen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der *agr*-Gruppe und dem SCC*mec*-Typ festzustellen, wurden diese beiden Eigenschaften in Abhängigkeit voneinander dargestellt (Abbildung 18).

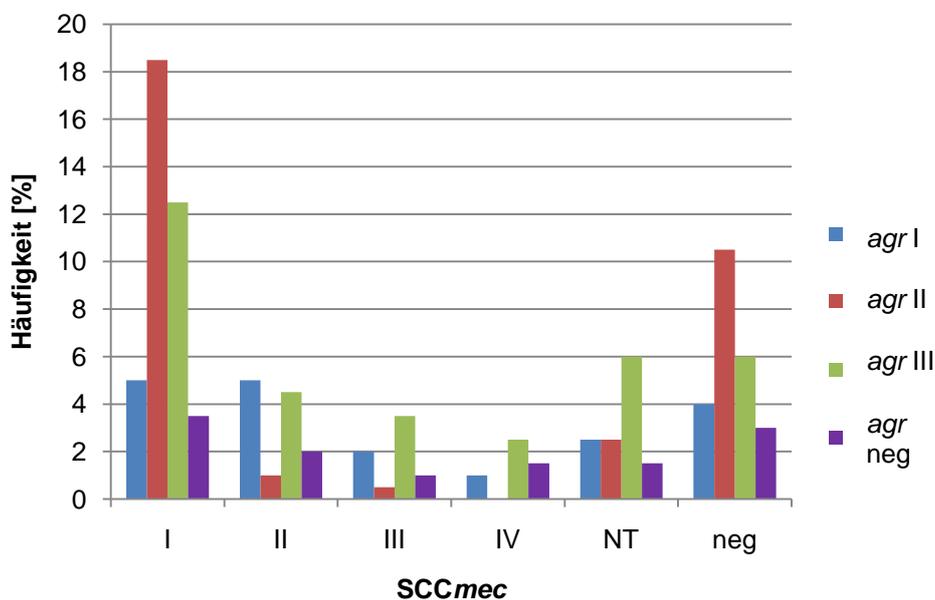


Abbildung 18: Korrelation zwischen *agr*-Gruppenspezifität und SCC*mec*-Typ ($n=200$), (I: SCC*mec*-Typ I; II: SCC*mec*-Typ II; III: SCC*mec*-Typ III; IV: SCC*mec*-Typ IV; NT: nicht typisierbar, neg: SCC*mec* negativ; *agr* I: *agr*-Gruppe I; *agr* II: *agr*-Gruppe II; *agr* III: *agr*-Gruppe III; *agr* neg: *agr*-negativ)

Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, wurde die *agr*-Gruppe II nahezu ausschließlich im Zusammenhang mit SCC*mec*-Typ I und *mecA*-negativem Typ nachgewiesen, wohingegen die *agr*-Gruppe I mit allen SCC*mec*-Typen und nicht typisierbaren Isolaten assoziiert war. Ähnliche Verhältnisse liegen bei *agr*-Gruppe III vor. Diese konnte in Kombination mit jedem SCC*mec*-Typ und besonders häufig mit SCC*mec*-Typ I, nicht typisierbaren Isolaten und Isolaten ohne *mecA*-Gen nachgewiesen werden. Die *agr*-negativen *S. epidermidis*-Isolate wurden eher seltener nachgewiesen und auch diese waren mit jedem SCC*mec*-Typ assoziiert.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die *S. epidermidis*-Isolate mit *agr*-Gruppe II vorwiegend mit SCC*mec*-Typ I bzw. *mecA*-negativem Typ korrelierten.

3.4.7 *agr*-Gruppenspezifität bei multiresistenten *S. epidermidis*-Isolaten

Bei der PCR-Untersuchung der *agr*-Gruppenspezifität der *S. epidermidis*-Isolate zeichnete sich ab, dass generell die *S. epidermidis*-Isolate überwiegend den *agr*-Gruppen II und III zugeordnet werden konnte. Insgesamt 41 *S. epidermidis*-Isolaten wurde ein multiresistentes Profil zugeordnet, da diese eine Resistenz gegen Penicillin, Oxacillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Erythromycin und Clindamycin aufwiesen, sowie *icaA/D*-positiv waren. Um zu überprüfen, ob sich die Verteilung bei multiresistenten, klinisch relevanten Isolaten verändert, wurde die Häufigkeit der *agr*-Gruppen bei diesen Isolaten betrachtet. Dabei zeigte sich tatsächlich eine veränderte Aufteilung, die in Abbildung 19 dargestellt ist.

Bei den multiresistenten Isolaten wurden die *agr*-Gruppen I und III häufiger nachgewiesen, wohingegen *agr*-Gruppe II nur sporadisch detektiert wurde. Von den multiresistenten *S. epidermidis*-Isolaten waren 9 Isolate (22 %) *agr*-negativ.

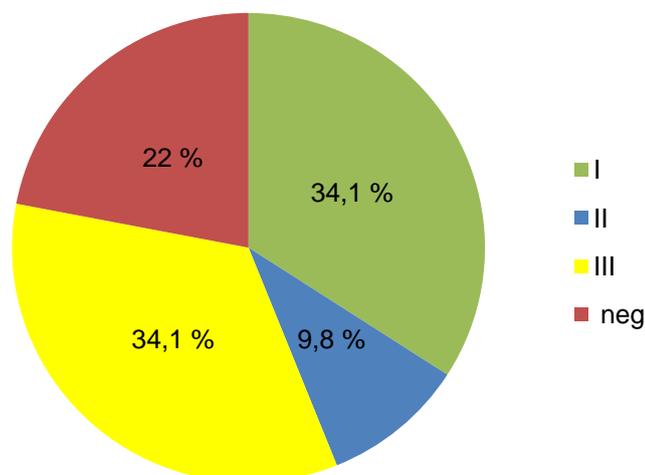


Abbildung 19: Häufigkeit der *agr*-Gruppen bei multiresistenten *S. epidermidis*-Isolaten ($n=41$), (I: *agr*-Gruppe I; II: *agr*-Gruppe II; III: *agr*-Gruppe III; neg: *agr*-negativ)

3.4.8 SCCmec-Typen bei multiresistenten *S. epidermidis*-Isolaten

Bei den unselektionierten *S. epidermidis*-Isolaten konnte am häufigsten SCCmec-Typ I nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde bei den multiresistenten Isolaten bei 39 % SCCmec-Typ II nachgewiesen, was eine Dominanz dieses Typs zeigte (Abbildung 20).

SCCmec-Typ I wurde bei 19,5 % der Isolate detektiert und SCCmec-Typ III wurde bei 12,2 % der Isolate nachgewiesen. SCCmec-Typ IV wurde bei allen Isolaten nur selten nachgewiesen. Bei den multiresistenten Isolaten hingegen beträgt der Anteil 14,6 % und ist damit sichtbar gestiegen. 9,8 % der multiresistenten *S. epidermidis*-Isolate waren nicht typisierbar und bei 4,9 % war kein *mecA*-Gen nachweisbar.

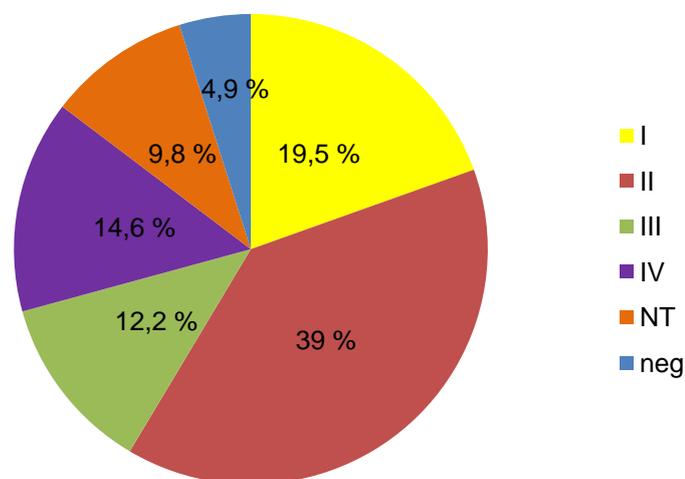


Abbildung 20: Häufigkeit der SCCmec-Typen bei multiresistenten *S. epidermidis*-Isolaten ($n=41$), (I: SCCmec-Typ I; II: SCCmec-Typ II; III: SCCmec-Typ III; IV: SCCmec-Typ IV; NT: nicht typisierbar, neg: SCCmec negativ)

3.4.9 Korrelation zwischen der *agr*-Gruppenspezifität und dem SCCmec-Typ bei multiresistenten *S. epidermidis*-Isolaten

Da sowohl die *agr*-Gruppe als auch die SCCmec-Typen bei multiresistenten *S. epidermidis*-Isolaten ein anderes Verteilungsmuster präsentierten, wurde auch die Korrelation dieser Gene bei den multiresistenten *S. epidermidis*-Isolaten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 zusammengefasst.

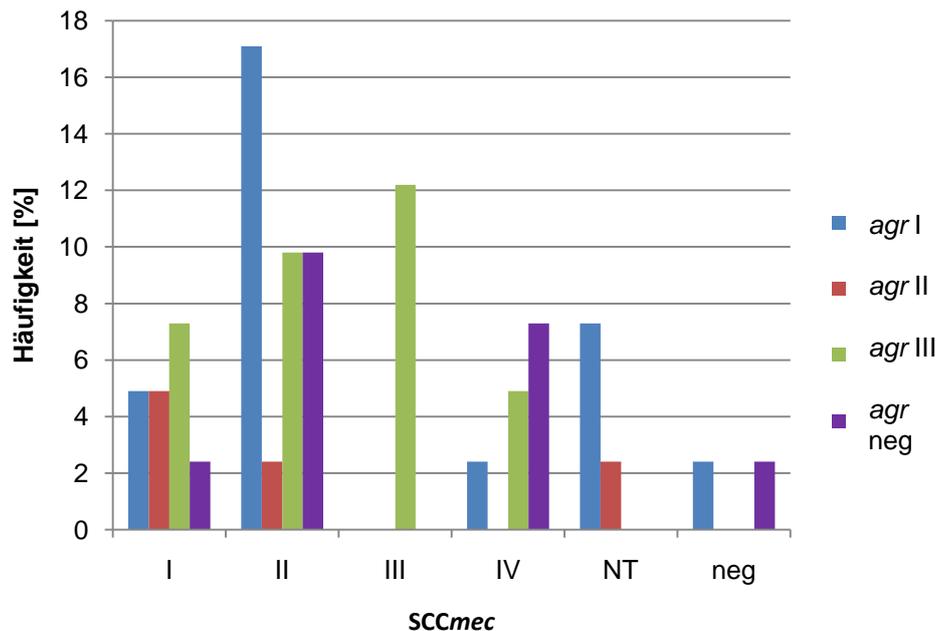


Abbildung 21: Korrelation zwischen der *agr*-Gruppe und dem *SCCmec*-Typ bei multiresistenten *S. epidermidis*-Isolaten ($n=41$), (I: *SCCmec*-Typ I; II: *SCCmec*-Typ II; III: *SCCmec*-Typ III; IV: *SCCmec*-Typ IV; NT: nicht typisierbar, neg: *SCCmec* negativ; *agr* I: *agr*-Gruppe I; *agr* II: *agr*-Gruppe II; *agr* III: *agr*-Gruppe III; *agr* neg: *agr*-negativ)

Die *agr*-Gruppen I und III und der *SCCmec*-Typ II wurden bei den multiresistenten Isolaten am häufigsten nachgewiesen (Abbildung 19 und 20). Es zeigte sich eine ausgeprägte Korrelation zwischen *agr*-Gruppe I und dem *SCCmec*-Typ II, jedoch kam diese *agr*-Gruppe selten auch im Zusammenhang mit den anderen *SCCmec*-Typen vor (Abbildung 21). Fernerhin war der *SCCmec*-Typ III bei den multiresistenten Isolaten ausschließlich mit *agr*-Gruppe III assoziiert. Zwischen *agr*-Gruppe III, *agr*-negativen Isolaten und *SCCmec*-Typ II zeichnete sich auch eine Korrelation ab. Da die *agr*-Gruppe III und *agr*-negative Isolate ebenfalls häufig in Kombination mit den anderen *SCCmec*-Typen auftraten, kann jedoch keine offensichtliche Präferenz des *SCCmec*-Typs II festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu trat bei der Untersuchung des gemeinsamen Vorkommens von *agr*-Gruppe und *SCCmec*-Typ aller Isolate eine auffallende Korrelation zwischen *agr*-Gruppe II und *SCCmec*-Typ I bzw. *mecA*-negativen Typ auf.

3.4.10 *SCCmec*-Typen und *agr*-Gruppen in Abhängigkeit vom klinischen Material

Bei der Betrachtung der *agr*-Gruppen in Abhängigkeit vom Untersuchungsmaterial (Tabelle 14) fiel auf, dass in *S. epidermidis*-Isolaten aus Katheterspitzen (ZVKs), Drains und Implan-

ten am häufigsten *agr*-Gruppe II nachgewiesen wurde, wohingegen bei Isolaten aus Blutkulturen und Gewebeproben *agr*-Gruppe III dominierte (Tabelle 14).

Tabelle 14: Verteilung der *agr*-Gruppen in den verschiedenen Untersuchungsmaterialien

<i>agr</i>-Gruppe	Untersuchungsmaterial				
	Blutkulturen	ZVK	Drain/ andere Katheter	Gewebeproben	Implantate
I	23,4 %	21,6 %	14,3 %	18,2 %	7,7 %
II	21,9 %	41,2 %	46,4 %	22,7 %	61,5 %
III	48,4 %	23,5 %	32,1 %	36,4 %	15,4 %
negativ	6,3 %	13,7 %	7,2 %	22,7 %	15,4 %

Eine Assoziation zwischen Untersuchungsmaterial und dem *SCCmec*-Typ wurde ebenfalls untersucht (Tabelle 15). In *S. epidermidis*-Isolaten aus Blutkulturen, Katheterspitzen (ZVKs), Drains und in Gewebeproben wurde *SCCmec*-Typ I am häufigsten nachgewiesen, der generell bei allen Isolaten am häufigsten nachgewiesen wurde. Bei Isolaten aus Implantaten konnte jedoch bei über 50 % der Isolate kein *mecA*-Gen nachgewiesen werden.

Tabelle 15: Verteilung der *SCCmec*-Typen in den verschiedenen Untersuchungsmaterialien

<i>SCCmec</i>-Typ	Untersuchungsmaterial				
	Blutkulturen	ZVK	Drain/ andere Katheter	Gewebeproben	Implantate
I	29,7 %	49,0 %	50,0 %	40,9 %	23,1 %
II	10,9 %	13,8 %	21,4 %	9,1 %	7,7 %
III	15,6 %	3,9 %	0 %	4,5 %	0 %
IV	1,6 %	7,8 %	7,2 %	4,5 %	7,7 %
nicht typisierbar	21,9 %	7,8 %	0 %	13,7 %	7,7 %
negativ	20,3 %	17,7 %	21,4 %	27,3 %	53,8 %

3.5 Sequenzierung einzelner *S. epidermidis*-Isolate

Insgesamt 40 *S. epidermidis*-Isolate wurden einer Multisequenzanalyse mittels MLST (*Multi-locus Sequence Typing*) unterzogen. Aus ökonomischen Gründen wurden 14 Isolate selektiert, die aus den klinischen Materialien isoliert wurden (Gewebeproben, ZVK, Implantate und

Drain/andere Katheter) und eine Resistenz gegenüber Penicillin, Oxacillin, Gentamicin und Ciprofloxacin aufwiesen. Weitere 26 *S. epidermidis*-Isolate aus Blutkulturen wurden ebenfalls mittels MLST analysiert.

Die MLST-Daten sind in Tabelle 16 nach den Materialarten, aus denen die *S. epidermidis*-Isolate gewonnen wurden, zusammengefasst

Tabelle 16: Multisequenzanalyse der selektionierten *S. epidermidis*-Isolate: dargestellt sind die Häufigkeiten der ermittelten Sequenztypen sowie die Materialart ($n=39$)

Materialart	Sequenztyp												
	2	5	6	10	21	23	32	43	48	59	130	135	242
BK	6	4	1	2	2	1	1	-	2	3	2	-	1
ZVK	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	2
Drain/ andere Katheter	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2
Implantate	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-
Gewebeproben	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-
Anzahl $n=39$	6	4	1	4	2	3	1	2	2	3	3	3	5

Die vier häufigsten Sequenztypen ST2, ST5, ST10 und ST242, stellen insgesamt 47,5 % der untersuchten Isolate dar. Dabei kann ST2 als der häufigste Sequenztyp mit 15 % ($n=6$ von 40) der untersuchten Isolate hervorgehoben werden. Weiterhin wurden auch die Sequenztypen ST5 und ST10 mit jeweils 10 % und ST242 mit 12,5 % häufiger nachgewiesen. Blutkultur-Isolate wurden am häufigsten als ST2 typisiert, aber auch ST5 und ST59 wurden in Blutkulturen mehrfach nachgewiesen. *S. epidermidis*-Isolate aus Katheterspitzen (ZVK und Drain/andere Katheter) wurden am häufigsten ST242 zugeordnet. Hervorzuheben ist, dass die selektionierten *S. epidermidis*-Isolate, die den Sequenztypen ST2, ST5, ST6, ST21, ST32, ST48 und ST59 zugeordnet wurden, aus Blutkulturen isoliert werden konnten.

Ein Isolat konnte keinem Sequenztyp eindeutig zugeordnet werden. Aufgrund dessen erscheint dieses nicht in Tabelle 16. Dieses Isolat wurde von Blutkulturen isoliert und könnte nach der Sequenzierung ST57, ST154 oder ST172 zugeordnet werden.

3.5.1 Vorkommen von IS256, *icaA/D*, *mecA* und *agr* in den Sequenztypen

Im Anschluss daran sollte festgestellt werden, ob bestimmte Sequenztypen mit den untersuchten Pathogenitäts- bzw. Virulenz-assoziierten Genen korrelierten (Tabelle 17).

Tabelle 17: Sequenztypen der *S. epidermidis*-Isolate und deren genetische Determinanten: Zusammenhängend wurden die genetischen Determinanten (*agr*, *icaA/D*, *SCCmec*) der *S. epidermidis*-Isolate der verschiedenen klonalen Linien betrachtet; Zahlen in Klammern beziffern die Isolatanzahl mit dem entsprechenden STs

ST	<i>icaA/D</i>		IS256		SCC <i>mec</i>						<i>agr</i>			
	pos	neg	pos	neg	I	II	III	IV	NT	neg	I	II	III	neg
2 (6)	6	-	5	1	-	3	3	-	-	-	2	-	3	1
5 (4)	1	3	1	3	3	-	-	-	1	-	-	3	1	-
6 (1)	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-
10 (4)	1	3	1	3	4	-	-	-	-	-	2	-	2	-
21 (2)	-	2	-	2	-	-	1	-	-	1	1	1	-	-
23 (3)	3	-	3	-	1	-	-	1	1	-	-	1	2	-
32 (1)	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
43 (2)	2	-	2	-	-	1	1	-	-	-	-	-	2	-
48 (2)	2	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	2	-
59 (3)	2	1	1	2	-	-	-	-	2	1	-	1	2	-
130 (3)	1	2	1	2	1	-	-	-	1	1	1	-	2	-
135 (3)	3	-	3	-	1	1	1	-	-	-	-	-	3	-
242 (5)	5	-	4	1	1	2	1	1	-	-	1	-	4	-

Die Mehrzahl der *S. epidermidis*-Isolate trugen sowohl das Insertionselement IS256 als auch das *icaA/D*-Gen. Auch eine Korrelation zwischen *SCCmec*-Typ und Sequenztyp wäre möglich, da z.B. ST5 und ST10 bis auf eine Ausnahme (ein ST5-Isolat war nicht *SCCmec*-typisierbar) ausschließlich Träger des *SCCmec*-Typ I waren. Isolate, die als ST2 und ST242 typisiert wurden, trugen ausnahmslos das *icaA/D*-Gen und es konnte zudem häufig IS256 detektiert werden. Sie waren alle *mecA*-Gen positiv, jedoch gehörten sie unterschiedlichen

SCC*mec*-Typen an. Hervorzuheben ist, dass die am häufigsten nachgewiesenen Sequenztypen stets Träger des *mecA*-Gens waren und infektionsepidemiologisch als bedeutende Erreger bei Kolonisierung bzw. Infektionen einzustufen waren.

3.5.2 Phylogenetische Verwandtschaft ausgewählter *S. epidermidis*-Isolate

Zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft der *S. epidermidis*-Isolate wurde der Neighbor-Joining-Algorithmus verwendet. Die Analyse wurde mit Hilfe der Software Splits Tree 4 durchgeführt. Die Neighbor-Joining Methode basiert auf dem Prinzip der „minimum evolution“ und erstellt einen Stammbaum, worin Nachbarn durch einen Knoten verbunden sind und die geringste Länge eines Armes angestrebt wird (Saitou *et al.* 1987). Die Verwandtschaftsverhältnisse können anhand der Topologie des Baumes und der Armlängen abgeschätzt werden (Saitou *et al.* 1987).

Die phylogenetische Verwandtschaft der *S. epidermidis*-Isolate mit den häufigsten Sequenztypen ist in Abbildung 22 dargestellt.

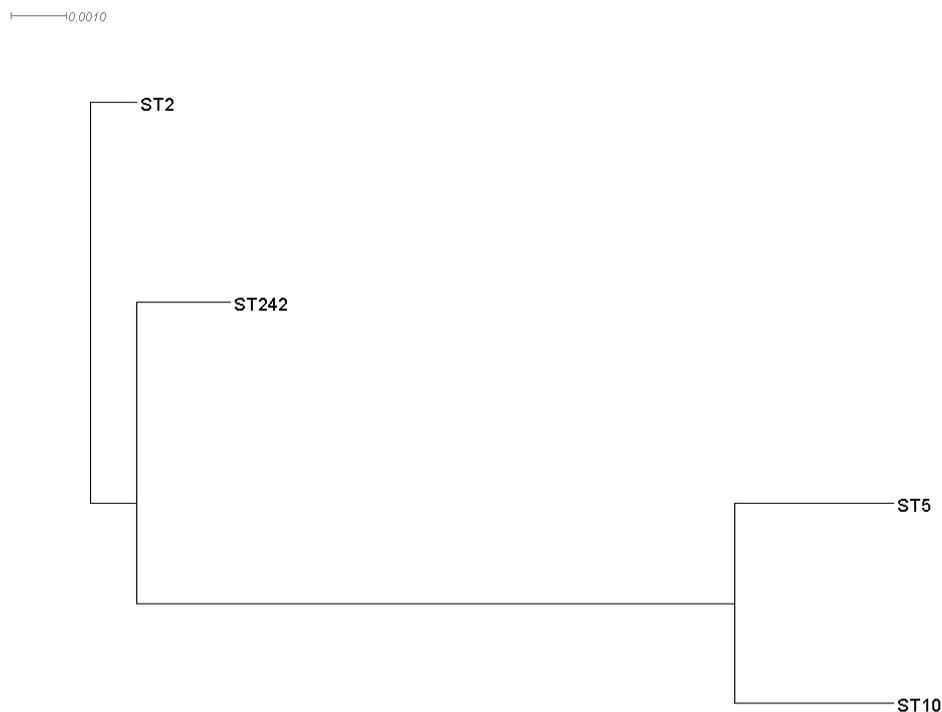


Abbildung 22: phylogenetische Verwandtschaft der am häufigsten nachgewiesenen Sequenztypen von *S. epidermidis* ($n=19$). Die Verwandtschaft wurde über *Multilocus Sequence Typing* (MLST) berechnet. ST5 und ST10 gruppieren sich zu einem Cluster.

Es wird deutlich, dass ST5 und ST10 durch einen Knoten verbunden waren und somit als genetisch nahe verwandt gelten. ST2 und ST242 stellten sich zu den vorgenannten Sequenztypen nicht als phylogenetisch nah verwandt dar.

Bei der näheren Betrachtung des phylogenetischen Baumes der *S. epidermidis*-Isolate in Abbildung 23 stellte sich heraus, dass sich zwei große Cluster abbildeten. Einem Cluster gehörten ST2 und ST242 an, während ST5 und ST10 dem anderen Cluster zugeordnet werden konnten.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass ST2 gemeinsam mit ST48 sowie ST23 mit ST135 jeweils ein Subcluster bildeten und damit phylogenetisch eng verwandt sind.

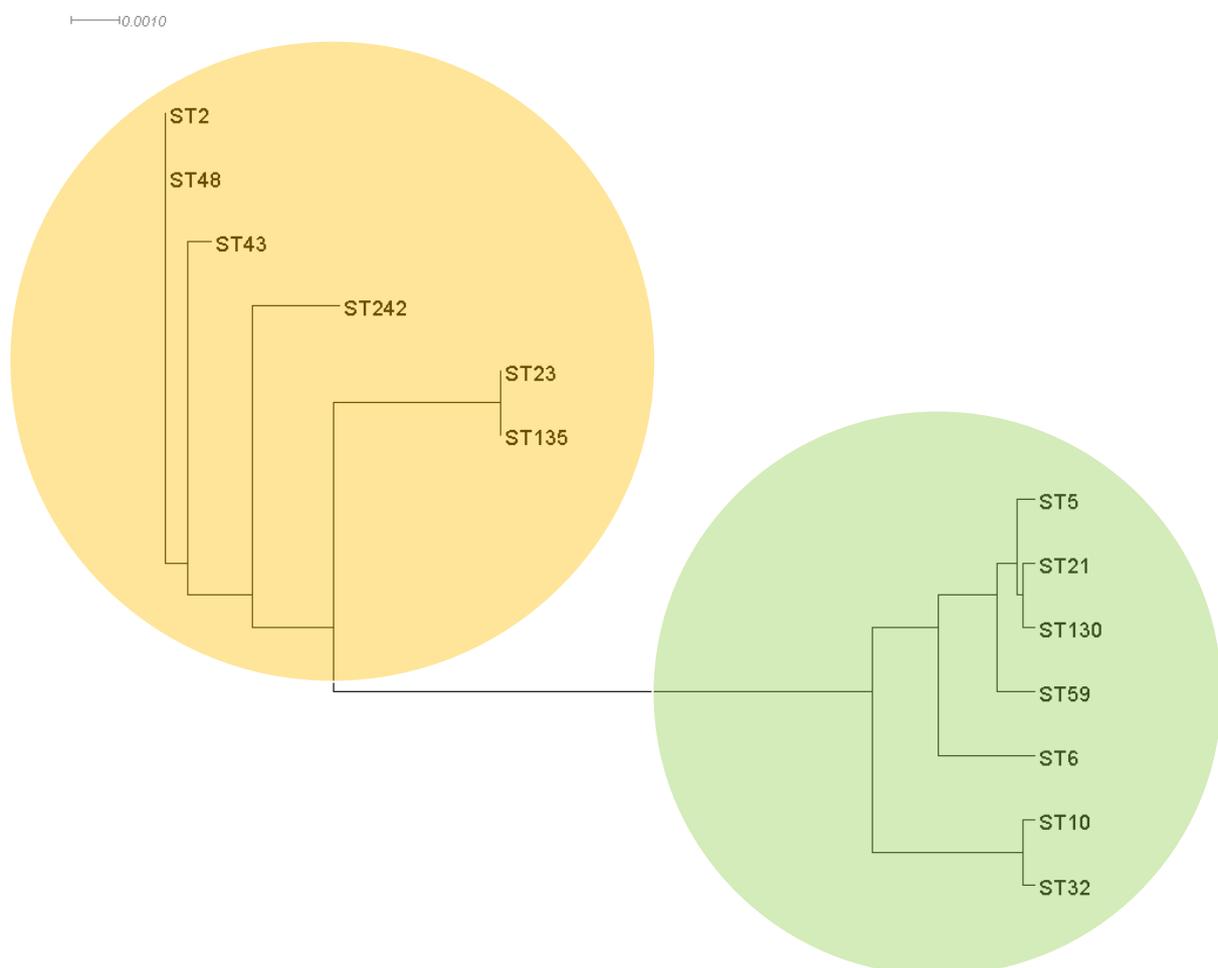


Abbildung 23: phylogenetische Verwandtschaft von *S. epidermidis* ($n=39$).

Es bildeten sich zwei große Cluster, die sich wiederum in weitere Subcluster unterteilten.

4 Diskussion

Staphylococcus epidermidis gehört zu den häufigsten Staphylokokken, die mit Implantat-assoziierten Infektionen im Zusammenhang stehen.

Aus einer aktuellen Statistik geht hervor, dass 32,57 % aller ZVK-assoziierten septischen Infektionen auf Intensivstationen allein durch Koagulase-negative Staphylokokken verursacht werden (Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) 2011).

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *S. epidermidis* (s. 1.2.). Der Anstieg von Infektionen mit *S. epidermidis* ist nicht zuletzt durch die steigende Anwendung von medizinischen Implantaten wie Kathetern, Herzschrittmachern, aber auch künstliche Gelenkimplantaten zu erklären. Bei der Besiedlung der Implantate spielt die Biofilmbildung eine entscheidende Rolle (Kloos *et al.* 1994).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der unterschiedlichen *S. epidermidis*-Isolate auf ihre phäno-und genotypischen Merkmale im Zusammenhang mit der Biofilmbildung.

4.1 Das Resistenzprofil der Isolate

Insgesamt 91,5 % aller *S. epidermidis*-Isolate erwiesen sich als resistent gegen Penicillin und 76 % waren resistent gegen Oxacillin. Dies entspricht einem noch größeren Anteil an resistenten Isolaten im Vergleich zu den ermittelten Daten von Kresken *et al.* (1999), die 60,2 % der *S. epidermidis*-Isolate als Oxacillin resistent klassifizierten und 87 % als Penicillin resistent. Ebenso wurden eine höhere Rate an resistenten Isolaten gegenüber den Daten von Kresken *et al.* für Erythromycin (70,5 % versus 55,3 %), Ciprofloxacin (57 % versus 46,7 %) und Clindamycin (67,5 % versus 34,8 %) ermittelt. Lediglich für Gentamicin ermittelten Kresken *et al.* eine höhere Rate an resistenten *S. epidermidis*-Isolaten (46 % versus 52,6 %). Die ermittelten Werte zeigten, dass der Anteil an resistenten Isolaten stetig zunimmt. Diese Tendenz wurde schon von Kresken *et al.* (1999) durch den Vergleich der Resistenzraten 1990 und 1995 erkannt und konnte durch diese Datenerhebung 2009 bestätigt werden.

Ein multiresistentes Verhalten wurde bei 29,5 % aller Isolate festgestellt (Resistenz gegen Penicillin, Oxacillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Erythromycin und Clindamycin). Kresken *et al.* (1999) ermittelten ähnliche Resistenzprofile.

Betrachtete man das Resistenzprofil in Abhängigkeit von der Herkunft der Isolate, fiel auf, dass die *S. epidermidis*-Isolate, die von Implantaten wie beispielsweise Material von Totalendoprothesen (TEP) oder Schrittmacherelektroden gewonnen wurden, in nur 76,92 %

resistent gegen Penicillin getestet wurden. Isolate, die von ZVK-Spitzen stammten, zeigten hingegen mit 92,16 % eine viel höhere Resistenzrate gegen Penicillin. Zusätzlich zur Penicillinresistenz wiesen 45,1 % dieser Isolate eine Resistenz gegen Oxacillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Erythromycin und Clindamycin auf und müssen daher als multiresistent angesehen werden. Nicht überraschend ist die ebenfalls hohe Rate an multiresistenten Isolaten bei Drains und anderen Kathetern (32,14 %).

Bei Isolaten aus Blutkulturen konnte bei 93,75 % eine Resistenz gegen Penicillin festgestellt werden. Becker *et al.* (2010) ermittelten bezüglich der Penicillinresistenz bei *S. epidermidis*-Isolaten aus Blutkulturen mit 93,3 % ähnliche Resistenzdaten. Für Oxacillin wurde ebenfalls eine annähernd gleiche Resistenzrate ermittelt (79,9 % in der vorliegenden Arbeit versus 80,9 % bei Becker *et al.* (2010)). Höhere Resistenzraten ermittelten Becker *et al.* (2010) für Gentamicin (53,6 %) und für Erythromycin (75,3 %). In der vorliegenden Arbeit wurden 37,5 % der Blutkultur-Isolate resistent gegen Gentamicin und 65,6 % resistent gegen Erythromycin getestet.

4.2 Biofilmbildung

Die genotypische Fähigkeit zur Biofilmbildung wurde durch Bestimmung von *icaA/D* untersucht. Insgesamt 62 % aller Isolate sind *icaA/D*-positiv. Dies entspricht einem noch höheren Anteil an *icaA/D*-positiven Isolaten, als dieser in der Untersuchung von Diamond-Hernández *et al.* (2010) für *S. epidermidis* ermittelt wurde.

Um die Biofilmbildung der Isolate phänotypisch zu untersuchen, erfolgte die Kultivierung auf Kongorot-Agar. Insgesamt bildeten 32 % aller Isolate schwarze Kolonien auf Kongorot-Agar und waren somit phänotypisch in der Lage einen Biofilm zu generieren. Somit bildet nur etwa die Hälfte der Isolate, die die genetischen Voraussetzungen haben, tatsächlich auch einen Biofilm. Chaieb *et al.* (2005) ermittelten einen höheren Anteil an *icaA/D*-positiven Isolaten (72,7 %), die auch imstande waren Biofilm zu bilden.

Vermutlich spielen zusätzliche Faktoren neben dem Vorhandensein des *ica*-Genkomplexes eine Rolle bei der Biofilmbildung (Cho 2001). Hudetz *et al.* (2008) beschrieben in ihrer Arbeit, dass der Einfluss der *icaA/D*-Gene auf die Biofilmbildung *in vitro* sehr viel größer als *in vivo* sei. Dieser Aspekt der Übertragbarkeit von *in vitro*-Modellen auf die tatsächliche Infektion im lebenden Organismus darf also nicht vernachlässigt werden.

Offenbar spielen Faktoren, wie Umweltbedingungen, Nährstoffangebot etc., eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung. Auch subinhibitorische Konzentrationen von verschiedenen Antibiotika (z.B. Tetrazykline, Gentamicin, Clindamycin, Teicoplanin) und Stressfaktoren, wie hohe Temperatur und die Osmolarität, haben laut Rachid *et al.* (2000) einen induzierenden oder reprimierenden Effekt auf die Biofilmformation.

Bei der Betrachtung der Biofilmbildung in Abhängigkeit von der Materialart (Abbildung 8) fiel auf, dass Isolate aus Blutkulturen und von Katheterspitzen (ZVK) nur in rund einem Viertel der Fälle (26,6 % bzw. 27,5 %) einen Biofilm bildeten. *S. epidermidis*-Isolate von Implantaten hingegen waren viel häufiger (46,2 %) in der Lage einen Biofilm zu bilden. Möglicherweise hat also auch die Materialart einen Einfluss auf die Biofilmbildung, auch wenn dieser eher gering ist. Über eine eher untergeordnete Rolle der verschiedenen Metalloberflächen der Implantate bei der Biofilmbildung berichteten auch Hudetz *et al.* (2008).

Die Abweichung hinsichtlich der Häufigkeit der Biofilmbildung könnte auch aufgrund von unterschiedlichen Umweltbedingungen bei den verschiedenen Herkunftsorten der Isolate entstanden sein. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass insgesamt 64 Isolate von Blutkulturen untersucht wurden, aber nur 13 Isolate von Implantaten, somit eine ungleiche Anzahl an Daten in den einzelnen Gruppen vorliegen und folglich die erhobenen Daten nur bedingt vergleichbar sind.

Isolate, die einen Biofilm bildeten, haben eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika (Evans *et al.* 1987, Nichols *et al.* 1988, Gristina *et al.* 1989, Vuong *et al.* 2002, Vuong *et al.* 2004a). Saginur *et al.* (2006) wiesen ebenfalls eine höhere Resistenzrate von *S. epidermidis*-Isolaten im Biofilm gegenüber Antibiotika nach. Sie empfehlen für eine suffiziente Therapie eine Kombination von Antibiotika und stellten Rifampicin in Kombination mit anderen Wirkstoffen als besonders wirksam gegenüber Biofilm-bildenden Isolaten heraus (Saginur *et al.* 2006). Raad *et al.* (2007) untersuchten die Effektivität unterschiedlicher Antibiotika gegenüber Methicillin-resistenten *S. aureus*, der in Biofilm eingebettet ist. Sie stellten fest, dass Minocyclin, Daptomycin und Tigecyclin viel effektiver in der Therapie sind als Linezolid und Vancomycin (Raad *et al.* 2007). Rifampicin nimmt auch in dieser Studie eine besondere Rolle ein, da es einerseits in der Monotherapie nur eine schlechte Wirksamkeit aufgrund von sehr schneller Resistenzentwicklung zeigte, andererseits in der Kombinationstherapie mit den anderen Antibiotika eine schnellere Elimination der MRSA-Isolate bewirkte (Raad *et al.* 2007). Womöglich stellt ein Biofilm eine Diffusionsbarriere für Antibiotika dar, obwohl dies von Dunne bestritten wird, da es zumindest für Vancomycin oder Rifampicin nicht zutrifft (Dunne *et al.* 1993, Cho 2001, Donlan *et al.* 2002, Dunne 2002). Eine weitere mögliche Ursache für die höhere Resistenz ist die geringe Wachstumsrate von Bakterien innerhalb eines Biofilmes, da hierdurch die Antibiotikaaufnahme vermindert ist (Donlan *et al.* 2002). Gagnon *et al.* (1992) zeigten, dass bei einer Katheter-assoziierten Infektion mit *S. epidermidis* erst nach sieben Tagen Therapie mit Vancomycin eine erste Heilung erzielt werden konnte. Des Weiteren ermittelten diese Autoren einen s-förmigen Kurvenverlauf für den Zusammenhang zwischen der erfolgreichen Heilung dieser Infektion mit Vancomycin und der Therapiedauer (Gagnon *et al.* 1992).

In der vorliegenden Untersuchung waren 45,3 % der Isolate, die einen Biofilm bildeten, resistent gegen Penicillin, Oxacillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Erythromycin und Clindamycin, wobei nur 29,5 % aller Isolate ein resistentes Verhalten gegen die genannten Antibiotika aufwiesen. Dies unterstützt also die Annahme, dass Biofilmbildner häufiger eine verminderte Empfindlichkeit gegen Antibiotika haben.

Drei der untersuchten Isolate bildeten einen Biofilm, obwohl die *ica*-Gene nicht nachgewiesen wurden. Chaieb *et al.* (2005) berichteten sowohl von *ica*-positiven *S. epidermidis*-Isolaten, die phänotypisch keinen Biofilm bildeten (s.o.), als auch von einem *S. epidermidis*-Isolat, welches *ica*-Gen negativ war, jedoch einen Biofilm produzieren konnte. Kogan *et al.* (2006) charakterisierten ebenfalls *S. epidermidis*-Isolate, die einen Biofilm produzierten, obwohl kein *ica*-Gen nachweisbar war. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Insertion von IS256 in den *ica*-Genkomplex. Zwei der drei Isolate besitzen IS256. Somit ist eine Insertion in den *ica*-Genkomplex denkbar, der folglich mittels PCR nicht detektiert würde. Durch anschließende Exzision des Elementes, z.B. auf Grund von veränderten Umweltbedingungen, ist dann wiederum die PIA-Produktion möglich, da PIA vom *ica*-Operon kodiert wird (s. Kapitel 1.3).

Bei einem vollständigen *ica*-Genkomplex ist die Transkription der entsprechenden Abschnitte möglich und somit kann die PIA-Produktion realisiert werden. Ziebuhr *et al.* (1997,1999) beschrieben diesen Prozess als Phasenvariation, denn dies ermöglicht dem Erreger eine dynamische Antwort auf veränderte Umweltbedingungen zu geben. Dieser Prozess ist ebenfalls eine mögliche Erklärung für die oben beschriebene Häufung von *icaA/D*-positiven Isolaten, die keinen Biofilm bilden, da insgesamt 63,5 % dieser Isolate das Insertionselement IS256 besitzen. Möglicherweise ist dieses Element bei diesen Isolaten dafür verantwortlich, dass die Transkription des *ica*-Genkomplexes durch die Insertion von IS256 negativ beeinträchtigt werden könnte.

Eine wichtige Rolle der Oberflächenproteine *Aap* und *Bap* bei Biofilm-bildenden Isolaten ohne das Vorhandensein der *ica*-Gene wurde in verschiedenen Untersuchungen diskutiert (Hussain *et al.* 1997, Tormo *et al.* 2005). Weitere vertiefende Untersuchungen sind nötig, um weitere Einflussfaktoren der Biofilmbildung und des *ica*-Genkomplexes zu erschließen.

4.3 Insertionselement IS256

Es wurde beschrieben, dass IS256 als Marker zur Differenzierung zwischen invasiven und kommensalen Isolaten eingesetzt werden kann (Gu *et al.* 2005).

52,5 % aller untersuchten *S. epidermidis*-Isolate waren für das Insertionselement IS256 positiv. Bei den multiresistenten Isolaten konnte hingegen bei rund 95 % das Insertionselement nachgewiesen werden. Folglich kann es durchaus als valider Marker betrachtet wer-

den. Gu *et al.* (2005) ermittelten ähnliche Daten und schlussfolgerten, dass IS256 als ein guter Marker zur Differenzierung zwischen invasiven und nicht invasiven Isolaten herangezogen werden könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Hypothese.

Weiterhin kann eine Korrelation von IS256 mit dem *icaA/D*-Genlokus festgestellt werden. Bei insgesamt 79 % der Isolate, die das Insertionselement besaßen, konnte *icaA/D* nachgewiesen werden. Diese Beobachtung machten auch Kozitskaya *et al.* (2004). Durch das Vorhandensein von IS256 und *icaA/D* könnten die Isolate hinsichtlich der Phasenvariation Vorteile haben. Darüber hinaus hatten 47 % der *S. epidermidis*-Isolate, die sowohl IS256 als auch *icaA/D*-positiv waren, ein breites Resistenzprofil (Penicillin, Oxacillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Erythromycin, Clindamycin) und insgesamt 66 % waren resistent gegen Oxacillin und Gentamicin. Kozitskaya *et al.* (2004) beschrieben ebenfalls eine Korrelation zwischen IS256 und der Resistenz gegen Oxacillin und Gentamicin. Bestimmt man nur IS256, ergibt sich ein Anteil von 68,6 % an resistenten Isolaten (Resistenz gegen Oxacillin und Gentamicin). Somit erhält man aus der zusätzlichen Bestimmung von *icaA/D* keinen Vorteil, da die Kombination beider Marker keine wesentliche Differenz zwischen resistenten und sensiblen Isolaten erreicht.

Das Insertionselement IS256 ist demzufolge ein guter Marker für die klinische Relevanz und ist assoziiert mit Multiresistenz und den *ica*-Genen.

4.4 *agr*-Gruppenspezifität

Das *accessory gene regulator-(agr)* System wird als *Quorum-sensing*-System betrachtet und kommt sowohl bei pathogenen als auch nicht-pathogenen Isolaten vor (Otto 2001, 2004). Es erlaubt die Anpassung an Umweltbedingungen in Abhängigkeit von der Zelldichte und ist ein Regulator von Virulenzfaktoren (Otto 2001, 2004).

Für *S. epidermidis* sind drei verschiedene *agr*-Gruppen bekannt (Dufour *et al.* 2002, Li *et al.* 2004). In dieser Arbeit konnten die *agr*-Gruppen II und III mit 33 % und 35 % am häufigsten nachgewiesen werden, wohingegen die *agr*-Gruppe I mit rund 20 % seltener detektiert wurde. Insgesamt 25 Isolate erwiesen sich als *agr* negativ.

Die vorliegenden Daten unterscheiden sich von den veröffentlichten Daten von Li *et al.* (2004), da diese bei klinischen Isolaten in über 2/3 der Fälle *agr*-Gruppe I nachwies und die *agr*-Gruppen II und III nur zu 19,3 % und 12,5 % detektiert wurden. Die untersuchten Isolate der Studie stammten ausschließlich aus China, was eine mögliche Erklärung für die voneinander abweichenden Ergebnisse wäre. Womöglich spielen andere Faktoren sowie Umweltbedingungen eine Rolle.

4.4.1 *agr*-Gruppenspezifität in Abhängigkeit vom Resistenzverhalten

Bei der Betrachtung der multiresistenten Isolate fiel auf, dass sich der Anteil der Häufigkeiten der *agr*-Gruppen veränderte. Die *agr*-Gruppen I und III dominierten mit jeweils 34,1 %, während *agr*-Gruppe II lediglich in 9,8 % der Fälle nachgewiesen wurde. 22 % der Isolate waren *agr*-negativ und damit hat der Anteil dieser Gruppe im Vergleich zu allen Isolaten zugenommen. Die Tatsache, dass die *agr*-Gruppe II bei den multiresistenten Isolaten nur noch selten nachgewiesen wurde, könnte dafür sprechen, dass diese *agr*-Gruppe eher mit klinisch weniger bedeutsamen Isolaten assoziiert ist. Die Zunahme der *agr*-Gruppe I bei den multiresistenten Isolaten im Vergleich zur Häufigkeitsverteilung der *agr*-Gruppen bei allen *S. epidermidis*-Isolaten spricht für eine Assoziation mit eher pathogenen Isolaten und bestätigt somit die Resultate von Li *et al.* (2004). Das bei den multiresistenten Isolaten im Vergleich zu allen *S. epidermidis*-Isolaten häufiger kein *agr*-Gen nachweisbar war, ist nicht überraschend, da *agr*-Mutanten eine erhöhte primäre Anhaftung in der ersten Phase der Biofilmbildung aufweisen und somit zum Beginn einer Kolonisierung einen Vorteil haben (Vuong *et al.* 2003). Somit wirkt sich eine *agr*-Mutation nicht generell negativ auf das Überleben der Isolate aus und in der Literatur wurde auf das spontane Vorkommen von *agr*-negativen Isolaten hingewiesen (Li *et al.* 2004, Batzilla 2006).

Nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte wird das *agr*-System aktiviert, die Produktion von Oberflächenproteinen wird herunterreguliert und es werden mehr Exoenzyme synthetisiert, was einen Vorteil für die *agr*-positiven Isolate hinsichtlich des Langzeitüberlebens darstellen kann (Novick *et al.* 1999). Die *agr*-negativen *S. epidermidis*-Isolate bilden einen dickeren Biofilm und haben Schwierigkeiten mit der Ablösung, die jedoch wichtig ist für die Absiedlung einzelner Isolate, um neue Kolonien an anderen Orten zu bilden (Vuong *et al.* 2003, 2004b, Batzilla 2006).

Es kommen *S. epidermidis*-Isolate vor, bei denen permanent kein *agr* nachgewiesen wurde (Vuong *et al.* 2004b). Zudem wurde in der Literatur beschrieben, dass *agr*-negative Isolate häufiger bei Implantat-assoziierten Infektionen isoliert wurden und dass vermutlich *agr*-negative *S. epidermidis*-Isolate hinsichtlich Besiedlung bzw. Kolonisation erfolgreicher sind (Vuong *et al.* 2004b).

Neben dem *agr*-System existiert auch das *luxS*-System als *Quorum-sensing*-System in *S. epidermidis* (Xu *et al.* 2006). Ähnlich wie das *agr*-System hat auch das *luxS*-System einen hemmenden Einfluss auf die Biofilmbildung (Xu *et al.* 2006). Möglicherweise spielt dieses System eine wichtige Rolle in der Regulation der Biofilmbildung bei *agr*-negativen Isolaten.

4.5 SCCmec-Typ

Die Resistenz gegenüber Oxacillin und anderen Betalaktam-Antibiotika wird über ein modifiziertes Penicillin-bindendes Protein (*PBP2a*) vermittelt, an dem Laktame nur mit niedriger Affinität binden können (Chambers 1988, Mombach Pinheiro Machado *et al.* 2007). Dieses Protein wird von *mecA* kodiert, welches sich wiederum in einem Komplex befindet, der SCCmec (staphylococcal cassette chromosome *mec*) genannt wird (Chambers *et al.* 1985, Chambers 1997, Katayama *et al.* 2000). Bei Koagulase-negativen Staphylokokken werden verschiedene Typen unterschieden, wobei die Klassifikation in die einzelnen Typen mittels Kombination des *mec*-Komplexes und des *ccr*-Typs erfolgt (Ito *et al.* 2001, Ziebuhr *et al.* 2006, Mombach Pinheiro Machado *et al.* 2007). Viele Isolate müssen bei Koagulase-negative Staphylokokken jedoch als nicht typisierbar eingeordnet werden (Mombach Pinheiro Machado *et al.* 2007, Ruppé *et al.* 2009, Garza-González *et al.* 2010, Iorio *et al.* 2012).

SCCmec-Typ I konnte mit 39,5 % am häufigsten nachgewiesen werden. Seltener nachgewiesen wurde SCCmec-Typ II mit 12,5 % und SCCmec-Typ III mit 7 %. Mehrfach wurde auch SCCmec-Typ IV mit 5 % nachgewiesen. In 23,5 % der Fälle wurde kein SCCmec detektiert und 12,5 % der *S. epidermidis*-Isolate waren nicht typisierbar. Mombach Pinheiro Machado *et al.* (2007) untersuchten 129 Methicillin-resistente Koagulase-negative Staphylokokken aus Blutkulturen und ermittelten ebenfalls SCCmec-Typ I als den am häufigsten vorkommenden Typ bei *S. epidermidis*, wobei der Typ IV ebenso nur selten detektiert wurde. Vereinzelt wurden Isolate von Mombach Pinheiro Machado *et al.* (2007) als nicht typisierbar eingeordnet. Die Abweichungen hinsichtlich der Verteilung der SCCmec-Typen zwischen der vorliegenden Arbeit und der von Mombach Pinheiro Machado *et al.* (2007) finden sich bei SCCmec-Typ II und III, da in deren Studie Typ III fast genauso häufig wie SCCmec-Typ I war und SCCmec-Typ II in keinem Isolat nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit Typ III mit 7 % seltener und Typ II mit 12,5 % etwas häufiger nachgewiesen.

Ein möglicher Grund für die differenten Ergebnisse sind abweichende Therapieoptionen, eine divergente Resistenzlage und ein anderes Patientenkollektiv, da Mombach Pinheiro Machado *et al.* (2007) nur Methicillin-resistente Isolate aus Brasilien untersuchten.

Miragaia *et al.* (2007) untersuchten ebenfalls die Zuordnung zum SCCmec-Typ bei *S. epidermidis*, allerdings betrachteten sie nur MRSE-Isolate (Methicillin-resistenter *Staphylococcus epidermidis*). In deren Untersuchung war SCCmec-Typ IV der häufigste Typ, gefolgt von SCCmec-Typ III. Nur vereinzelt wiesen sie SCCmec-Typ I, II und V nach. Mehrfach wurden Isolate als nicht typisierbar eingeordnet. Wiederum eine andere Verteilung der SCCmec-Typen bei MRSE-Isolaten ermittelten Wisplinghoff *et al.* (2003). Diese Arbeitsgruppe detektierte ebenfalls SCCmec-Typ IV als den am häufigsten vorkommenden Typ. Fast genauso oft

wiesen sie jedoch den SCC*mec*-Typ II nach und weiterhin häufig den SCC*mec*-Typ III. Sehr vereinzelt wurde SCC*mec*-Typ I nachgewiesen.

Die unterschiedlichen Häufigkeiten der SCC*mec*-Typen bei *S. epidermidis*-Isolaten sind ein Hinweis darauf, dass dieses Merkmal relativ leicht übertragen werden kann, möglicherweise findet auch ein horizontaler Gentransfer zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* statt (Wisplinghoff *et al.* 2003, Hanssen *et al.* 2004, Miragaia *et al.* 2005, 2007, 2009). Ito *et al.* (2001) vermuten, dass SCC*mec* als genetisches Element zum Informationsaustausch zwischen Staphylokokken dienen könnte.

4.5.1 Korrelation der SCC*mec*-Typen mit der Antibiotikaresistenz

Auf der SCC*mec*-Kassette können Bakterien neben dem *mecA*-Gen für die Oxacillin-Resistenz auch andere Resistenzgene unterschiedlicher Antibiotikaklassen tragen (Ito *et al.* 2001).

In der Abbildung 17 wird deutlich, dass Isolate, die *mecA* positiv waren, zusätzlich zu der Resistenz gegenüber Betalaktam-Antibiotika resistenter gegenüber Antibiotika wie Clindamycin, Erythromycin, Ciprofloxacin und Gentamicin waren als Isolate ohne *mecA*-Gen. Isolate mit dem SCC*mec*-Typ II wiesen eine hohe Resistenzrate gegenüber allen Antibiotika mit Ausnahme von Tetrazyklin auf. Des Weiteren fällt auf, dass Isolate mit dem SCC*mec*-Typ IV im Vergleich zu Isolaten anderer SCC*mec*-Typen häufiger eine Resistenz gegen Tetrazyklin und Cotrimoxazol aufweisen. Die anderen SCC*mec*-Typen wiesen (mit Ausnahme von SCC*mec*-Typ II und Cotrimoxazol) eine vergleichsweise geringere Resistenz gegen diese Antibiotika auf, jedoch wurden nur wenige Isolate ($n=10$) SCC*mec*-Typ IV zugeordnet, so dass die Ergebnisse mit Vorsicht beurteilt werden sollten. Den SCC*mec*-Typen und den nicht typisierbaren Isolaten gemeinsam war die hohe Resistenzrate gegen Clindamycin und Erythromycin. Gegenüber Ciprofloxacin zeigten ebenfalls viele SCC*mec*-Typen eine relativ hohe Resistenzrate. SCC*mec*-Typ III bildet jedoch eine Ausnahme, da hier eine vergleichsweise niedrigere Resistenzrate gegenüber Clindamycin und Erythromycin auffiel.

Die Ergebnisse sind für SCC*mec*-Typ I und III mit denen von Mombach Pinheiro Machado *et al.* (2007) teilweise vergleichbar, jedoch ermittelte diese Arbeitsgruppe bei beiden Typen eine z.T. deutlich höhere Resistenzrate gegenüber Gentamicin und Cotrimoxazol und bei SCC*mec*-Typ I eine etwas niedrigere Resistenzrate gegenüber Clindamycin und Erythromycin. Für SCC*mec*-Typ III fiel bei Mombach Pinheiro Machado *et al.* (2007) hingegen eine höhere Resistenzrate gegenüber Clindamycin und Erythromycin auf. Die in diesen Fällen ermittelten divergenten Resistenzraten könnten auf einen geographisch unterschiedlichen Verbrauch dieser Antibiotika hindeuten.

4.5.2 SCC*mec*-Typ bei Multiresistenz

Bei den multiresistenten Isolaten veränderte sich die Verteilung der SCC*mec*-Typen. SCC*mec*-Typ I wurde nur noch bei 19,5 % nachgewiesen, während die anteilige Häufigkeit von Typ II deutlich zunahm, da dieser bei rund 39 % der Isolate detektiert wurde. Der Anteil der Isolate mit SCC*mec*-Typ III ist leicht gestiegen und der Anteil von SCC*mec*-Typ IV nahm bei den multiresistenten Isolaten ebenfalls sichtbar zu. Der Anteil an *mecA*-negativen Isolaten wiederum reduzierte sich bei Multiresistenz erwartungsgemäß deutlich. Die Zunahme von SCC*mec*-Typ II bei multiresistenten Isolaten kann als Hinweis gedeutet werden, dass dieser Typ generell häufiger mit Multiresistenz assoziiert ist. Demgegenüber steht allerdings die bereits erläuterte Hypothese der leichten Übertragbarkeit von SCC*mec* zwischen verschiedenen Isolaten. Der hohe Anteil an SCC*mec*-Typ II bei den multiresistenten *S. epidermidis*-Isolaten in der Magdeburger Population könnte des Weiteren ein Hinweis dafür sein, dass durch erschwerte Therapieoptionen der Erfolg der Eradikationsmaßnahmen vermindert wird und dadurch eine Persistenz dieser Isolate unterstützt wird. Möglicherweise werden Resistenzgene von bestimmten SCC*mec*-Typen bevorzugt übertragen. Zu dieser Theorie sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Die *mecA*-negativen *S. epidermidis*-Isolate waren erwartungsgemäß in den meisten Fällen sensibel gegenüber Oxacillin (89,4 %). 10,6 % der *mecA*-negativen Isolate waren jedoch resistent gegenüber Oxacillin. Bei einigen *mecA*-negativen *S. epidermidis*-Isolaten wurde sogar eine Resistenz gegenüber mehreren Antibiotika festgestellt. Bei Betrachtung der SCC*mec*-PCR-Daten dieser *mecA*-negativen Isolate konnte regelmäßig (bis auf eine Ausnahme) mindestens ein Signal detektiert werden. Es wurde beschrieben, dass es Staphylokokken gibt, die ein SCC-Element tragen, in denen jedoch kein *mecA*-Gen nachzuweisen sei (IWG-SCC 2009). In der vorliegenden Arbeit war bei insgesamt drei Isolaten eine Multiresistenz nachweisbar (resistent gegen Penicillin, Oxacillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Erythromycin, Clindamycin), obwohl kein *mecA*-Gen detektiert wurde. Es könnte sich hierbei jedoch auch um ein verändertes *mecA*-Gen in der SCC-Kassette handeln. Möglicherweise sind für das beschriebene Resistenzverhalten in diesen Fällen Resistenzgene verantwortlich, die sich in der J-Region des SCC*mec*-Komplexes befinden (IWG-SCC 2009).

4.5.3 Korrelation zwischen SCC*mec*-Typ und der *agr*-Gruppe

Das *agr*-System als *Quorum-sensing*-System und der SCC*mec*-Komplex als Träger von Resistenzgenen spielen eine wichtige Rolle bei der Virulenz und der verminderten Empfindlichkeit von *S. epidermidis* (s. Kapitel 1.5 und 1.6). Es ist möglich, dass bestimmte *agr*-Gruppen besonders häufig mit distinkten SCC*mec*-Typen assoziiert sind. Bei der Untersuchung dieses Sachverhaltes wurde festgestellt, dass *agr*-Gruppe II besonders häufig mit

SCC*mec*-Typ I und mit Isolaten ohne *mecA*-Gen assoziiert war. Wurden nur die multiresistenten Isolate betrachtet, deutete sich hingegen eine deutliche Assoziation von *agr*-Gruppe I und SCC*mec*-Typ II an. Mit anderen SCC*mec*-Typen trat *agr*-Gruppe I nur vereinzelt auf. Die jeweiligen Typen, die generell bei multiresistenten Isolaten zugenommen haben, scheinen also auch häufig in Kombination miteinander aufzutreten. Bemerkenswert war auch, dass bei Multiresistenz SCC*mec*-Typ III ausschließlich mit *agr*-Gruppe III assoziiert war.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass solche Isolate, die dem SCC*mec*-Typ II und *agr*-Gruppe I zugeordnet werden, eine besonders hohe Pathogenität durch die auftretende Multiresistenz aufweisen.

4.5.4 Zuordnung zur *agr*-Gruppe und zum SCC*mec*-Typ in Abhängigkeit von der Materialart

Li *et al.* (2004) stellten fest, dass Isolate, die von Blutkulturen und Kathetern stammten, besonders oft der *agr*-Gruppe I zugeordnet wurden und zudem die Gruppe I häufig mit Pathogenität assoziiert war.

In der vorliegenden Arbeit (Tabelle 14) konnte *agr*-Gruppe II häufig bei Katheterspitzen, Drains und Implantaten nachgewiesen werden, wohingegen bei Blutkulturen und Gewebeproben *agr*-Gruppe III dominierte. Die Datenunterschiede zwischen Li *et al.* (2004) und der vorliegenden Arbeit könnten darin liegen, dass die *S. epidermidis*-Population aus unterschiedlichen geographischen Regionen (China und Deutschland) mit den entsprechenden Umweltbedingungen untersucht wurden.

Des Weiteren wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den SCC*mec*-Typen und der Materialart besteht (Tabelle 15). Hierbei wurde festgestellt, dass der häufig detektierte SCC*mec*-Typ I öfter bei *S. epidermidis*-Isolaten aus Blutkulturen, Katheterspitzen (ZVKs), Drains und in Gewebeproben vorkam. Im Gegensatz dazu konnte bei Implantaten in über der Hälfte der Isolate kein *mecA*-Gen detektiert werden. Dies könnte zu der Annahme führen, dass *S. epidermidis*-Isolate, die Fremdkörper-assoziierte Infektionen verursachen, vermutlich ein vermindertes Resistenzverhalten gegenüber Antibiotika zeigen. Uckay *et al.* (2009) berichteten jedoch, dass ein Biofilm eine phänotypische Resistenz gegenüber nahezu allen Antibiotika vermittelt, da die Antibiotika nur schlecht durch den Biofilm diffundieren können. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden (s. Kapitel 4.2.), dass Isolate, die einen Biofilm bildeten mit 45,3 % im Vergleich zu allen Isolaten (29,5 %) eine höhere Resistenzrate gegenüber Penicillin, Oxacillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Erythromycin und Clindamycin aufwiesen.

4.6 Analyse des Sequenztyps

Unter den selektierten *S. epidermidis*-Isolaten ($n=40$) dominierten die Sequenztypen ST2 (15 %) und jeweils mit 10 % ST5, ST10 sowie ST242 mit 12,5 %.

Kozitskaya *et al.* (2005) untersuchten ebenfalls die *S. epidermidis*-Isolate mittels MLST, die zum großen Teil aus Deutschland stammten, aber auch aus Irland, Norwegen und Nordamerika. Diese wurden einerseits aus Blukulturen, u.a. von venösen Zugängen und bei katheter-assoziierten Harnwegsinfektionen und andererseits als Standortflora aus Nasenabstrichen gesunder Freiwilliger isoliert. Diese Arbeitsgruppe wies ST27 am häufigsten nach. Ebenfalls häufig detektierten sie ST2 und vereinzelt auch ST5. Insgesamt enthielten diese beiden Sequenztypen aber nur selten das *mecA*-Gen und waren nur sporadisch *ica*-Gen positiv. Miragaia *et al.* (2007) untersuchten *S. epidermidis*-Isolate aus 17 unterschiedlichen Ländern, u.a. Dänemark, Island, Portugal, Bulgarien etc. sowohl von gesunden als auch von erkrankten Personen. Sie untersuchten *S. epidermidis*-Isolate mittels MLST und detektierten 74 unterschiedliche Sequenztypen. Teilweise wurde auch der SCC*mec*-Typ bestimmt. Diese Arbeitsgruppe wies gleichermaßen ST2 als den am häufigsten vorkommenden Typen nach. Dabei konnten sie SCC*mec*-Typ II, III und IV diesem Sequenztyp zuordnen oder der SCC*mec*-Typ war nicht typisierbar. Li *et al.* (2009) analysierten insgesamt 80 *S. epidermidis*-Isolate aus einem Krankenhaus in Shanghai von Blutkulturen, Kathetern und Liquor und ermittelten 16 unterschiedliche Sequenztypen. Auch in deren Studie wurde ST2 am häufigsten detektiert. Weiterhin stellten sie fest, dass alle Isolate, die dem ST2 zugeordnet wurden, *ica*-Gen positiv waren und häufig Biofilm bildeten. Darüber hinaus wurden diese ausnahmslos als IS256 positiv und Träger von SCC*mec*-Typ III detektiert.

Insgesamt 35 Oxacillin-resistente *S. epidermidis*-Isolate wurden von Iorio *et al.* (2012) in Brasilien untersucht. Dabei wurden ST2 ebenso am häufigsten detektiert (45,7 %). Des Weiteren konnte ST23 häufig nachgewiesen werden (25,7 %). Isolate, die dem Sequenztyp ST2 zugeordnet wurden, waren alle *ica*-Gen positiv und Träger von SCC*mec*-Typ III oder der SCC*mec*-Typ war nicht typisierbar (4 Isolate). Isolate mit dem Sequenztyp ST23 waren gleichermaßen alle *ica*-Gen positiv und wurden größtenteils SCC*mec*-Typ IV zugeordnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde ST2 gleichermaßen als häufigster Sequenztyp nachgewiesen und ebenfalls ausnahmslos als Träger von *icaA/D* ermittelt. Weiterhin waren 83,33 % der Isolate IS256 positiv und konnten jeweils zu gleichen Anteilen SCC*mec*-Typ II und III zugeordnet werden. Diese Daten stützen größtenteils die Ergebnisse von Li *et al.* (2009) und Iorio *et al.* (2012). Bei Isolaten mit dem ST23 konnten in der vorliegenden Arbeit, wie auch bei Iorio *et al.* (2012), immer die *ica*-Gene nachgewiesen werden. Die Ergebnisse hinsichtlich des SCC*mec*-Typs bei ST23 sind jedoch different, da Iorio *et al.* (2012) bei den meisten Isolaten SCC*mec*-Typ IV detektierten, während in der vorliegenden Arbeit bei Isolaten mit

ST23 die SCC*mec*-Typen I und IV sowie ein nicht typisierbarer SCC*mec*-Typ nachgewiesen wurde. Weitere Unterschiede ergaben sich bei der Analyse von ST5 und ST10. In der vorliegenden Arbeit wurden beiden Sequenztypen bis auf eine Ausnahme (nicht typisierbarer SCC*mec*-Typ bei ST5) dem SCC*mec*-Typ I zugeordnet und waren zu 75 % *icaA/D* und IS256 negativ. Li *et al.* (2009) hingegen detektierten für ST5 grundsätzlich SCC*mec*-Typ V und für ST10 ausschließlich SCC*mec*-Typ IV und weiterhin sehr häufig das Insertionselement IS256. Übereinstimmend waren jedoch die geringen Raten an *icaA/D*-positiven Isolaten im Zusammenhang mit beiden Sequenztypen.

Eine mögliche Ursache für die Differenzen ist die Auswahl der Isolate, da die genannten Arbeitsgruppen häufig Isolate von gesunden und erkrankten Personen untersuchten, während in der vorliegenden Arbeit wie auch bei Li *et al.* (2009) nur Material von erkrankten Personen untersucht wurde. Andererseits deuten die detektierten Unterschiede darauf hin, dass der Sequenztyp nicht zwangsläufig mit dem SCC*mec*-Typ korreliert und sind zudem ein weiterer Hinweis darauf, dass einige SCC*mec*-Typen eine genetische Determinante darstellen, welche relativ einfach unter den Spezies ausgetauscht werden könnte.

Bei der Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen dem Sequenztyp und der Materialart fiel auf, dass alle Isolate mit ST2 aus Blutkulturen isoliert wurden. Des Weiteren stammen alle Isolate, die den ebenfalls häufig nachgewiesenen ST5 und ST59 zugeordnet wurden, ebenfalls aus Blutkulturen. ST242 wurde häufig von Katheterspitzen isoliert. Demzufolge ist eine Wechselbeziehung zwischen Sequenztyp und Materialart also durchaus möglich. Andererseits konnte aber keine Assoziation zwischen den übrigen Materialarten und dem detektierten Sequenztyp gesehen werden.

4.6.1 Verwandtschaft der Sequenztypen

Wie bereits erläutert (s. 3.5.2.), konnten die ST2 und ST242 einem Cluster zugeordnet werden, während ST5 und ST10 einem anderen Cluster angehören. Die Topologie des phylogenetischen Baumes der am häufigsten nachgewiesenen Sequenztypen (Abbildung 22) verdeutlicht jedoch, dass ST5 und ST10 enger verwandt sind als ST2 und ST242. Hervorzuheben wäre, dass ST5 und ST10 hinsichtlich des SCC*mec*-Typs ausnahmslos übereinstimmen (Typ I), während dies für ST2 und ST242 nicht zutrifft. Jedoch ist auch hier eine Präferenz der SCC*mec*-Typen II und III zu eruieren. Des Weiteren zeigt der phylogenetische Baum (Abbildung 23), dass alle nachgewiesenen Sequenztypen relativ eng miteinander verwandt sind. Kozitskaya *et al.* (2005) vermuteten, dass der Hauptteil der Stämme relativ eng verwandt ist und ST2 ein Vorfahre der anderen Sequenztypen ist. Dies könnte die Dominanz von ST2 in unterschiedlichen geographischen Regionen erklären.

Der Nachweis der großen Anzahl verschiedener Sequenztypen und die dennoch relativ enge Verwandtschaft zeigt die geringe, aber bestehende genetische Ungleichheit und lässt vermuten, dass sich *S. epidermidis* relativ schnell an veränderte Umgebungsbedingungen anpasst (Miragaia *et al.* 2007).

Der Nachweis der verschiedenen Sequenztypen am Universitätsklinikum Magdeburg zeigt, dass zwar kein vorherrschender Sequenztyp zirkuliert, jedoch sind die nachgewiesenen Stämme relativ eng miteinander verwandt. Diese haben sich vermutlich als nosokomiale Stämme an die Umweltbedingungen des Klinikums gut angepasst.

4.7 Ausblick

Die *agr*-Pheromone von unterschiedlichen Spezies oder Subgruppen einer Spezies zeigen das Phänomen der Kreuzinhibition, da eigene Pheromone die *agr*-Antwort induzieren und Pheromone anderer Spezies die *agr*-Antwort reprimieren (Ji *et al.* 1997, Otto *et al.* 2001, Otto 2001, Vuong *et al.* 2002, 2003). Otto *et al.* (1999) konnten nachweisen, dass Pheromone von *S. epidermidis* wirksame Inhibitoren des *agr*-Systems von *S. aureus* sind und Virulenzfaktoren von *S. aureus* hemmen. Möglicherweise stellt dies bei einer hohen Zelldichte von *S. epidermidis* einen Vorteil gegenüber *S. aureus* dar, weil die produzierten Pheromone die Virulenzfaktoren von konkurrierenden *S. aureus*-Stämmen hemmen (Otto *et al.* 1999). Die Pheromone von *S. epidermidis* sind stärkere Inhibitoren des *agr*-Systems von *S. aureus* als umgekehrt und dies ist möglicherweise der Grund für die Dominanz von *S. epidermidis* auf der Haut (Otto *et al.* 2001, Otto 2001).

Quorum-sensing Hemmer als Therapieansatz von Infektionen könnten Vorteile haben, da nur die Expression von Virulenzfaktoren gehemmt wird und diese Substanzen nicht bakterio-lytisch sind. Somit ist das Risiko einer Resistenzentwicklung geringer (Otto *et al.* 1999). Infektionen werden aber häufig von verschiedenen Subgruppen verursacht. Die Therapie mit Pheromonen hätte somit das Risiko zwar eine Subgruppe zu reprimieren, dafür aber eine andere zu aktivieren (Otto *et al.* 1999). Zudem kommt es durch Hemmung von *agr* zwar zur Abnahme der Expression von Toxinen, aber andererseits zur Förderung der Expression von kolonisierenden Faktoren. Damit steigt das Risiko für den Übergang in chronische Infektionen (Otto 2001).

Fernerhin führt die Inhibition von *agr* zur stärkeren Biofilmbildung (Vuong *et al.* 2003, 2004b). Obwohl ein RNAIII-hemmendes Peptid (RNAIII-inhibiting peptide „RIP“) einige Staphylokokkeninfektionen inhibierte, war eine verstärkte Biofilmbildung zu verzeichnen (Vuong *et al.* 2000b, 2003, Balaban *et al.* 2003, Giacometti *et al.* 2003, Dell'Acqua *et al.* 2004, Vuong *et al.* 2004b, Otto 2004). Der Einsatz von Pheromonen zur Therapie von Infektionen mit *S. epidermidis* ist somit sehr kritisch zu betrachten.

Das *Quorum-sensing*-System reguliert wichtige Komponenten zum Überleben von *S. epidermidis*. Einerseits werden Faktoren, die für das Überleben in widrigen Umweltbedingungen nötig sind, verstärkt produziert, andererseits Prozesse wie Zellteilung und Translation herab reguliert (Yao *et al.* 2006). Das *agr*-System spielt also eine wichtige Rolle bei der Anpassung der Bakterien an die Umwelt und beim Ausweichen vor dem Immunsystem des Wirtes (Yao *et al.* 2006). Dies macht es zu einem interessanten Angriffsort für mögliche Therapieansätze. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet nötig, um neue, sichere und effektive Therapieoptionen zu entwickeln.

Diese Arbeit liefert Hinweise darauf, dass es Korrelationen zwischen verschiedenen genotypischen Markern, der Pathogenität und dem Resistenzverhalten von *S. epidermidis*-Isolaten gibt. Dies eröffnet wiederum die Möglichkeit, Kontaminationen von Infektionen zu unterscheiden und risikogerecht eine Infektion mit *S. epidermidis* zu therapieren. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind meines Erachtens daher sinnvoll und notwendig.

Es müssen neue Strategien evaluiert werden, um *S. epidermidis*-Infektionen besser zu bekämpfen. Wir benötigen ein besseres Verständnis über die Beziehung kommensaler und infektionsassoziierter Lebensgewohnheiten von diesem Erreger.

Zusammenfassung

Staphylococcus epidermidis, einer der Vertreter koagulase-negativer Staphylokokken, galt lange Zeit als physiologischer Bestandteil der menschlichen Hautflora ohne pathologische Relevanz. Heute weiß man, dass *S. epidermidis* häufig Ursache von Implantat-assoziierten Infektionen und Nosokomialinfektionen ist. Die Biofilmbildung ist der wichtigste Pathogenitätsfaktor.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 200 Isolate auf die genotypische und phänotypische Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass nur rund die Hälfte der Isolate mit der genetischen Voraussetzung zur Biofilmbildung diesen tatsächlich bilden. Neben dem Vorhandensein des *ica*-Gens (*intercellular adhesin*) sind möglicherweise weitere Faktoren entscheidend. Etwa 29,5 % der Isolate zeigten ein breites Resistenzprofil (Resistenz gegen Penicillin, Oxacillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Erythromycin und Clindamycin). Die Bedeutung des Insertionselementes IS256 als Marker für die klinische Relevanz bei *S. epidermidis*-Infektionen konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Des Weiteren wurden sowohl SCC*mec*-(*staphylococcal cassette chromosome mec*) Typ als auch die *agr*-(*accessory gene regulator*) Gruppe untersucht. Hierbei wurde *agr*-Gruppe II und III und der SCC*mec*-Typ I am häufigsten nachgewiesen, wohingegen bei Multiresistenz *agr*-Gruppe I und III und SCC*mec*-Typ II dominierte.

Zudem wurde eine mögliche Korrelation von SCC*mec* und *agr* untersucht, wobei *agr*-Gruppe II mit SCC*mec*-Typ I und *mecA*-negativen *S. epidermidis*-Isolaten assoziiert war. Ein gehäuftes gemeinsames Auftreten zwischen der *agr*-Gruppe I und dem SCC*mec*-Typ II hingegen konnte bei Multiresistenz festgestellt werden. Des Weiteren wurde die Korrelation zwischen den SCC*mec*-Typen und der Antibiotikaresistenz untersucht, wobei ein großer Teil der Isolate, die dem SCC*mec*-Typ II zugeordnet wurden, resistent gegen Clindamycin, Gentamicin und Erythromycin sowie Ciprofloxacin und Cotrimoxazol waren. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die *agr*-Gruppe III häufiger bei Blutkulturen und in Gewebeproben nachgewiesen wurde, während *agr*-Gruppe II eher in *S. epidermidis*-Isolaten aus Katheterspitzen (ZVK), Drains und Implantaten vorkam. Bei Blutkulturen, Katheterspitzen (ZVK), Drains und in Gewebeproben dominierte SCC*mec*-Typ I, wohingegen bei Implantaten häufig kein *mecA*-Gen nachgewiesen werden konnte.

Eine Auswahl von *S. epidermidis*-Isolaten ($n=40$) wurde einer genotypischen Untersuchung mittels MLST (*Multilocus Sequence Typing*) unterzogen. Hierbei konnte keine Dominanz einer bestimmten klonalen Linie von *S. epidermidis* für das Universitätsklinikum Magdeburg aufgezeigt werden.

Jedoch wurden 45 % der genotypisch untersuchten Isolate den klonalen Linien ST2, ST5, ST10 und ST242 zugeordnet, die phylogenetisch relativ eng miteinander verwandt waren.

Literaturverzeichnis

1. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L: Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.*39.2151-2156 (2001)
 2. Balaban N, Giacometti A, Cirioni O, Gov Y, Ghiselli R, Mocchegiani F, Viticchi C, Del Prete MS, Saba V, Scalise G, Dell'Acqua G: Use of the *Quorum-sensing* inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation in vivo by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.*187. 625–630 (2003)
 3. Batzilla CF: Untersuchungen zur Biofilmbildung und zum *Quorum-sensing* in *Staphylococcus epidermidis*. Diss. Universität Würzburg. 2006.pp.1-12; p.94; p.108 (2006)
 4. Becker A, Rosenthal EJK und Studiengruppe, Karlsruhe: Antibiotika-Empfindlichkeit von Sepsis-Erregern 2006-2007. *Chemoth. J.*19. 28-39 (2010)
 5. Bowden MG, Chen W, Singvall J, Xu Y, Peacock SJ, Valtulina V, Speziale P, Höök M: Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* 151.1453-1464 (2005)
 6. Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A: Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *J. Hosp. Infect.*61.225-230 (2005)
 7. Chambers HF: Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.*10.781-791(1997)
 8. Chambers HF, Hartmann BJ, Tomasz A: Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *J. Clin. Invest.* 76. 325- 331 (1985)
 9. Chambers, HF: Methicillin-resistant staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 1.173-186 (1988)
 10. Cho SH: Epidemiologische und molekulare Untersuchungen zu Biofilmbildung in *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus*. Diss. Universität Würzburg.2001. pp.9-17;pp104-110 (2001)
 11. Christensen GD, Barker LP, Mawhinney TP, Baddour LM, Simpson WA: Identification of an Antigenic Marker of Slime Production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 58. 2906- 2911 (1990)
 12. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH: Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22. 996-1006 (1985)
 13. CLSI Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. 8th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA (2009)
 14. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP: *icaR* Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of *ica* Operon Expression and Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 184. 4400- 4408 (2002)
 15. Dell'Acqua G, Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Saba V, Scalise G, Gov Y, Balaban N: Suppression of drug-resistant Staphylococcal Infections by the *Quorum-sensing* inhibitor RNAIII-inhibiting peptide. *J. Infect. Dis.* 190. 318– 320 (2004)
-

16. Descloux S, Rossano A, Perreten V: Characterization of new staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and topoisomerase genes in fluoroquinolone and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. J. Clin. Microbiol. 46. 1818-1823 (2008)
 17. Diemond-Hernández B, Solórzano-Santos F, Leaños-Miranda B, Peregrino-Bejarano L, Miranda-Navales G: Production of *ica*A_{DBC}-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with Staphylococcal device-related infections. BMC Infect. Dis.10.68 (2010)
 18. Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, Bartscht K, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D: Glucose-related dissociation between *ica*A_{DBC} transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. J. Bacteriol. 185.2879-2886 (2003)
 19. Donlan RM, Costerton JW: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15.167-193. (2002)
 20. Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Bes M, Etienne J, Lina G: High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. J. Bacteriol. 184.1180-1186 (2002)
 21. Dunne WM Jr, Mason EO Jr, Kaplan SL: Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* Biofilm. Antimicrob Agents Chemother. 37.2522-2526 (1993)
 22. Dunne WM Jr: Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin. Microbiol. Rev.15.155-166 (2002)
 23. Dyke KG, Aubert S, El Solh N: Multiple copies of IS256 in staphylococci. Plasmid. 28.235-246 (1992)
 24. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG: The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99. 7687-7692 (2002)
 25. Evans RC, Holmes CJ: Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. Antimicrob. Agents Chemother. 31. 889–894 (1987)
 26. Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM: Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98.8821–8826 (2001)
 27. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT: New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J. Clin. Pathol. 42. 872–874 (1989)
 28. Gagnon RF, Richards GK, Subang R: Vancomycin therapy of experimental peritoneal catheter-associated infection (*Staphylococcus epidermidis*) in a mouse model. Perit. Dial.Int. 13.310-312 (1992)
 29. Garza-González E, Morfín-Otero R, Llaca-Díaz JM, Rodríguez-Noriega E: Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC *mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. Epidemiol. Infect. 138: 645-654 (2010)
 30. Geisel R, Schmitz FJ: Molekulare Evolution der MRSA- Entwicklung. Mikrobiologe. 13. 45- 54 (2003)
 31. Gerke C, Kraft A, Süssmuth R, Schweitzer O, Götz F: Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. J. Biol. Chem.273.18586-18593 (1998)
-

32. Ghebremedhin B: Vergleichende phäno-und genotypische Untersuchungen zur klonalen Dynamik und Evolution von *Staphylococcus aureus*-Stämmen in Magdeburg (Deutschland) und in zwei afrikanischen Staaten (Nigeria und Namibia), Habilitationsschrift Universität Magdeburg. 2009. pp. 1-237 (2009)
 33. Ghebremedhin B, Olugbosi MO, Raji AM, Layer F, Bakare RA, König B, König W: Emergence of a community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with a unique resistance profile in Southwest Nigeria. *J. Clin. Microbiol.* 47.2975-2980 (2009)
 34. Giacometti A, Cirioni O, Gov Y, Ghiselli R, Del Prete MS, Mocchegiani F, Saba V, Orlando F, Scalise G, Balaban N, Dell'Acqua G: RNA III inhibiting peptide inhibits in vivo biofilm formation by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47. 1979–1983 (2003)
 35. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43. 1367- 1378 (2002)
 36. Gristina AG, Jennings RA, Naylor PT, Myrvik QN, Webb LX: Comparative in vitro antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33. 813–816 (1989)
 37. Gu J, Li H, Li M, Vuong C, Otto M, Wen Y, Gao Q: Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Hosp. Infect.*61.342-348 (2005)
 38. Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41.95-98 (1999).
 39. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2.95-108 (2004)
 40. Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JU: Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob. Agents Chemother.* 48. 285- 296 (2004)
 41. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F: Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* 24.1013- 1024 (1997)
 42. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F: Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20.1083-1091 (1996)
 43. Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T: Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett.*298.133-136 (1992)
 44. Hof H, Dörries R: *Medizinische Mikrobiologie*. 4.Auflage,p.310; p.318; Thieme Verlag (Stuttgart) 2009
 45. Hudetz D, Ursic Hudetz S, Harris LG, Luginbühl R, Friederich NF, Landmann R: Weak effect of metal type and *ica* genes on staphylococcal infection of titanium and stainless steel implants. *Clin. Microbiol. Infect.* 14.1135-1145. (2008)
 46. Huebner J, Goldmann DA: Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* 50.223-36 (1999)
 47. Hussain M, Herrmann M, von Eiff C, Perdreau-Remington F, Peters G: A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* 65. 519- 524 (1997)
-

48. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53.4961-4967 (2009)
 49. Iorio NL, Caboclo RF, Azevedo MB, Barcellos AG, Neves FP, Domingues RM, dos Santos KR: Characteristics related to antimicrobial resistance and Biofilm formation of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 lineages in Rio de Janeiro hospitals, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72. 32-40 (2012)
 50. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K: Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48. 2637–2651(2004)
 51. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K: Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45. 1323–1336 (2001)
 52. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K: Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug. Resis. Updat.* 6. 41-52 (2003)
 53. Janzon L, Arvidson S: The role of the delta-lysine gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* 9. 1391- 1399 (1990)
 54. Jarvis WR, Martone WJ: Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 29. 19-24 (1992)
 55. Ji G, Beavis R, Novick RP: Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276.2027-2030 (1997)
 56. Ji G, Beavis R, Novick RP: Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* 93. 12055- 12059 (1995)
 57. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K: A new class of genetic element, Staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44. 1549- 1555 (2000)
 58. Kloos WE, Bannermann TL: Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7. 117-140 (1994)
 59. Knobloch JK, Jäger S, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D: RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect. Immun.* 72. 3838-3848 (2004)
 60. Koenig RL, Ray JL, Maleki SJ, Smeltzer MS, Hurlburt BK: *Staphylococcus aureus* *AgrA* binding to the RNAIII-*agr* regulatory region. *J. Bacteriol.* 186.7549-7555 (2004)
 61. Kogan G, Sadovskaya I, Chaignon P, Chokr A, Jabbouri S: Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin FEMS *Microbiol. Lett.* 255. 11- 16 (2006)
 62. Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W: The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun.* 72.1210-1215 (2004)
 63. Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD, Witte W, Ohlsen K, Ziebuhr W: Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 43.4751-4757 (2005)
-

64. Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS), nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ), Modul ITS-KISS, Referenzdaten, Berechnungszeitraum: Januar 2006 bis Dezember 2010; Art der Station: Alle; Erstellungsdatum: 23.05.2011
 65. Kresken M, Hafner D, Witte W, Reinert RR: Resistenzentwicklung bei Staphylokokken und anderen grampositiven Erregern gegenüber Chemotherapeutika im mitteleuropäischen Raum. *Chemoth. J.* 8. 136-144 (1999)
 66. Layer F, Ghebremedhin B, Moder KA, König W, König B: Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 44.2824-2830 (2006)
 67. Li H, Xu L, Wang J, Wen Y, Vuong C, Otto M, Gao Q: Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect. Immun.* 73. 3188-3191 (2005).
 68. Li M, Wang X, Gao Q, Lu Y: Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China *J. Med. Microbiol.* 58. 456-461 (2009)
 69. Li M, Guan M, Jiang XF, Yuan FY, Xu M, Zhang WZ, Lu Y: Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity. *J. Med. Microbiol.* 53.545-549 (2004)
 70. Lina G, Jarraud S, Ji G, Greenland T, Pedraza A, Etienne J, Novick RP, Vandenesch F: Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of *AgrC*, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 28. 655- 662 (1998)
 71. Lyon BR, Gillespie MT, Skurray RA: Detection and characterization of IS256, an insertion sequence in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 133. 3031-3038 (1987)
 72. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Begr. von Brock, T. D., hrsg. v. Goebel, W. Brock Mikrobiologie. pp 194-196, Spektrum Akademischer Verlag (Heidelberg-Berlin) 2001
 73. Mack D: Molekulare Mechanismen der Biofilmentstehung von *Staphylococcus epidermidis*. *Chemoth. J.* 8.166-176 (1999)
 74. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R: The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178.175- 183 (1996)
 75. Mack D, Siemssen N, Laufs R: Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect. Immun.* 60. 2048-2057 (1992)
 76. Mayville P, Ji G, Beavis R, Yang H, Goger M, Novick RP, Muir TW: Structure–activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96. 1218- 1223 (1999)
 77. Middendorf LR, Humphrey PG, Narayanan N, Roemer SC: Sequencing technology, In C.W. Sensen, eds., *Genomics and bioinformatics*. pp. 183-216 VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (2001)
 78. Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H: Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. *J. Clin. Microbiol.* 46.118-129 (2008)
 79. Miragaia M, Couto I, de Lencastre H: Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* [MRSE]. *Microb. Drug. Resist.* 11: 83- 93 (2005)
-

80. Miragaia M, de Lencastre H, Perdreau-Remington F, Chambers HF, Higashi J, Sulam PM, Lin J, Wong KI, King KA, Otto M, Sensabaugh GF, Diep BA: Genetic Diversity of Arginine Catabolic Mobile Element in *Staphylococcus epidermidis* PLoS ONE 4.e7722 (2009)
 81. Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H: Inferring a Population Structure for *Staphylococcus epidermidis* from Multilocus Sequence Typing Data. J. Bacteriol. 189. 2540-2552 (2007)
 82. Mombach Pinheiro Machado AB, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL: Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. J. Med. Microbiol. 56.1328–1333 (2007)
 83. Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL: Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. Antimicrob. Agents Chemother. 32. 518–523 (1988)
 84. Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, Pei L, Lindberg M, Guss B: A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. 66. 2666-2673 (1998)
 85. Novick RP, Projan S, Kornblum J, Ross H, Kreiswirth B, Moghazeh S. The *agr* P-2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. Mol Gen Genet. 248. 446- 458 (1995)
 86. Novick RP: Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence, Molecular Microbiol. 48. 1429- 1449 (2003)
 87. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S :Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. EMBO J. 12. 3967-3975 (1993)
 88. Novick RP, Muir TW: Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram- positive bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 2.40-45 (1999)
 89. O`Toole G, Kaplan HB, Kolter R: Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol.54. 49- 79 (2000)
 90. O`Gara JP, Humphreys H: *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications.J Med. Microbiol. 50.582-587 (2001)
 91. Oliveira DC, de Lencastre H: Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother.46.2155-61 (2002)
 92. Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H: Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*-Type VI. Antimicrob. Agents Chemother. 50.3457–3459 (2006)
 93. Otto M, Echner H, Voelter W, Götz F: Pheromone cross-inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun.69.1957-1960 (2001)
 94. Otto M. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator *agr* system. Peptides. 22.1603-1608 (2001)
 95. Otto M: *Quorum-sensing* control in Staphylococci-a target for antimicrobial drug therapy? FEMS Microbiol. Lett.241. 135- 141 (2004)
 96. Otto M: *Staphylococcus epidermidis*- the „accidental“ pathogen. Nature Reviews Microbiol. 7. 555-567 (2009)
 97. Otto M, Süßmuth R, Jung G, Götz F: Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system FEBS Lett. 424. 89-94 (1998)
-

98. Otto M, Süßmuth R, Vuong C, Jung G, Götz F: Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis agr* pheromone and derivatives. *FEBS Lett.* 450. 257-262 (1999)
 99. Petinaki E, Arvaniti A, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I: Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J. Antimicrob. Chemother.* 47.297-304 (2001)
 100. Presterl E: Implantatinfektionen. *Chemoth. J.* 18. 56-60 (2009)
 101. Raad I, Hanna H, Jiang Y, Dvorak T, Reitzel R, Chaiban G, Sherertz R, Hachem R: Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 51.1656-1660 (2007)
 102. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W: Effect of subinhibitory antibiotic concentration on the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44.3357- 3363 (2000).
 103. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Biochemie 1. Auflage* p. 492, p. 497f; Thieme Verlag (Stuttgart) (2006)
 104. Rice LB, Thorisdottir AS: The prevalence of sequences homologous to IS256 in clinical enterococcal isolates. *Plasmid.* 32.344-349 (1994)
 105. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JK, Heilmann C, Herrmann M, Mack D: Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* 55.1883-95 (2005)
 106. Ruppé E, Barbier F, Mesli Y, Maiga A, Cojocar R, Benkhalfat M, Benchouk S, Hassaine H, Maiga I, Diallo A, Koumaré AK, Ouattara K, Soumaré S, Dufourcq JB, Nareth C, Sarthou JL, Andremont A, Ruimy R: Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53. 442-449 (2009)
 107. Saginur R, StDenis M, Ferris W, Aaron, SD, Chan F, Lee C, Ramotar K: Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 50. 55-61 (2006)
 108. Saitou A; Nei M: The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4. 406-425 (1987)
 109. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74.5463-5467 (1977)
 110. Sharma VK, Hackbarth CJ, Dickinson TM, Archer GL: Interaction of native and mutant *MecI* repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. *J. Bacteriol.* 180.2160-2166 (1998)
 111. Steinacker M: Infektionen Frühgeborener und unreifer Neugeborener mit koagulase negativen Staphylokokken. *Diss. Universität Münster 2004: pp 1-5* (2004)
 112. Stock I: Koagulase-negative Staphylokokken als mutiresistente Krankheitserreger. *Arzneimitteltherapie* 25. 443- 456 (2007)
 113. Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, Enright MC: Improved Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* 45. 616–619 (2007)
-

114. Tormo MA, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penades JR: Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* 151. 2465- 2475 (2005)
115. Uçkay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F: Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann. Med.*41. 109-119 (2009)
116. Urwin R, Maiden MC: Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11. 479–487 (2003)
117. Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M: *Quorum-sensing* control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect. Dis.*188.706-718 (2003)
118. Vuong C, Götz F, Otto M: Construction and Characterization of an *agr* Deletion Mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.*68. 1048–1053 (2000a)
119. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M: A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* 279. 54881- 54886 (2004a)
120. Vuong C, Kocianova S, Yao Y, Carmody AB, Otto M: Increased colonization of in dwelling medical devices by quorum- sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. *J. Infect. Dis.* 190. 1498- 1505 (2004b)
121. Vuong C, Otto M: *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection* 4. 481- 489 (2002)
122. Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M: Impact of the *agr* *Quorum-sensing* system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 182. 1688–1693. (2000b)
123. Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL: Related clones containing SCC*mec*-Type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*47.3574-3579 (2003)
124. Xu L, Li H, Vuong C, Vadyvaloo V, Wang J, Yao Y, Otto M, Gao Q: Role of the luxS *Quorum-sensing* system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.*74. 488-496 (2006)
125. Yao Y, Vuong C, Kocianova S, Villaruz AE, Lai Y, Sturdevant DE, Otto M: Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense. *J. Infect. Dis.*193.841-848 (2006)
126. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF: A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science.* 291.1962-1965 (2001)
127. Ziebuhr W, Heilmann C , Götz F, Meyer P, Wilms K, Straube E, Hacker J.: Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* 65.890-896 (1997)
128. Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kränzler H, Batzilla C, Kozitskaya S: Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 28.14-20 (2006)
129. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Lössner I, Götz F, Hacker J: A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol.* 32.345-56 (1999)

Danksagung

Mein Dank gilt dem früheren Institutsdirektor Univ.-Prof. W. König und seinem Nachfolger Univ.-Prof. Dirk Schlüter für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Mikrobiologie durchzuführen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. habil. Dipl.-Biochem. Beniam Ghebremedhin ganz herzlich für die umfassende Betreuung dieser Arbeit, die gute Anleitung und sein Engagement bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie, besonders Petra Burmeister und Constance Schmidt für die Unterstützung und fortwährende Motivation bei Durchführung der Experimente. Ein großer Dank gebührt Soheila Frotan für ihren unentbehrlichen Einsatz und Ihre Hilfe bei der Durchführung der Sequenzierung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichte und mir immer mit grenzenloser Hilfe zur Seite stand. Insbesondere meiner Mutter danke ich für die liebevolle Unterstützung und die vielen Stunden der fachlichen Diskussionen, die mir wertvolle Anregungen gaben.

Dank gilt auch meinem Mann Thomas für die Unterstützung, sein Verständnis und für so vieles mehr.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zu *agr*-Genotypen, Biofilmbildung und SCC*mec*-Typen von klinischen *Staphylococcus epidermidis*-Isolaten am Universitätsklinikum Magdeburg

im Institut für Mikrobiologie mit Unterstützung durch PD B. Ghebremedhin, S. Frotan , P. Burmeister, C. Schmidt und E. Mertens ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in-oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

Lebenslauf

Name: Anke Martina Mertens
Geburtsdaten: 14.11.1985 in Magdeburg
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/1992 – 07/1993 Grundsule am Umfassungsweg, Magdeburg
08/1993 – 07/1996 Grundsule am Hopfengarten, Magdeburg
08/1996 – 03/2005 Norbertusgymnasium Magdeburg
Abschluss: Abitur

Studium

10/2005 – 11/2011 Otto von Guericke Universität Magdeburg
Studium der Humanmedizin
09/2007 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

08/2010 – 12/2010 Spital Uster/ Schweiz
Klinik für Chirurgie
12/2010 – 03/2011 Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Klinik für HNO-Heilkunde
04/2011 – 07/2011 Pfeiffersche Stiftungen Magdeburg
Klinik für Innere Medizin

Berufliche Tätigkeit

seit 01/2012 Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Klinik für HNO-Heilkunde

Magdeburg, d.

Anke Mertens

Anlagen

<u>Nr.</u>	<u>icaA/D</u>	<u>agr</u>	<u>SCCmec</u>	<u>IS256</u>	<u>Biofilm</u>	<u>Klinik</u>	<u>Material</u>
6347	pos	III	IV	pos	pink/rot	CHN4I	Drain/ andere Kath.
6363/2	neg	III	I	neg	pink/rot	KAR3I	Drain/ andere Kath.
6507/1	neg	II	I	neg	pink/rot	KAR04	Implantate
6507/2	neg	II	I	neg	pink/rot	KAR04	Implantate
6533	pos	I	II	pos	pink/rot	ORTO3	Gewebe
6534	pos	I	II	pos	schwarz	ORTO3	Gewebe
6607	neg	II	NT	pos	pink/rot	KAR3I	ZVK
6687	pos	II	neg	pos	schwarz	ORTO3	Implantate
6779	neg	II	I	neg	pink/rot	HAEM6	ZVK
6816	pos	neg	I	neg	pink/rot	ORT02	Gewebe
6818	pos	III	II	pos	schwarz	ORT03	Implantate
6820	pos	II	neg	pos	schwarz	ORT03	Implantate
6821	neg	II	I	neg	pink/rot	PAES1	Drain/ andere Kath.
6836	neg	II	I	neg	pink/rot	KAR3I	Drain/ andere Kath.
6947	pos	neg	neg	pos	schwarz	END11	ZVK
6954/1	pos	II	II	pos	schwarz	PAES1	Drain/ andere Kath.
6973/1	neg	II	I	neg	pink/rot	KARI	Drain/ andere Kath.
6973/2	pos	II	II	pos	schwarz	KARI	Drain/ andere Kath.
7066/1	neg	II	neg	neg	pink/rot	CHI2	ZVK
7066/2	neg	III	I	neg	pink/rot	CHI2	ZVK
7086	neg	neg	neg	pos	pink/rot	KAR03	Implantate
7087	neg	I	neg	neg	pink/rot	KAR03	Implantate
7129	neg	II	neg	neg	pink/rot	CHH02	Gewebe
7180/1	pos	I	II	pos	schwarz	CHI1I	Drain/ andere Kath.
7223	pos	neg	IV	pos	pink/rot	PAEFG	ZVK
7702	neg	I	neg	neg	pink/rot	CHI1	Gewebe
7761	neg	I	I	neg	pink/rot	HAE06	ZVK
7816	neg	neg	NT	pos	schwarz	AIT2I	Gewebe
7830	neg	I	I	pos	pink/rot	PAEI2	Drain/ andere Kath.
7832/1	neg	neg	I	pos	pink/rot	PAEI2	Drain/ andere Kath.
7835	neg	III	I	pos	pink/rot	NEP7	Gewebe
7947	neg	neg	I	neg	pink/rot	CHH02	Gewebe

<u>Nr.</u>	<u>icaA/D</u>	<u>agr</u>	<u>SCCmec</u>	<u>IS256</u>	<u>Biofilm</u>	<u>Klinik</u>	<u>Material</u>
7981	neg	I	I	neg	pink/rot	ORT03	Gewebe
8145	neg	II	neg	neg	pink/rot	GYNA	Implantate
8210	pos	I	IV	pos	schwarz	GHI4	ZVK
8234	pos	II	neg	pos	pink/rot	NEP7	Drain/ andere Kath.
8271	pos	III	I	pos	schwarz	ORTO2	Gewebe
8305	pos	neg	II	pos	pink/rot	PAEI2	ZVK
8306	pos	I	II	pos	schwarz	PAEI2	ZVK
8307	pos	I	II	pos	schwarz	PAEI2	Drain/ andere Kath.
8308	pos	III	II	pos	schwarz	PAEI2	Drain/ andere Kath.
8375	neg	II	neg	neg	pink/rot	CHN4I	ZVK
8395/1	neg	II	I	neg	pink/rot	AIT2I	ZVK
8395/2	neg	II	II	neg	schwarz	AIT2I	ZVK
8466	pos	III	II	pos	schwarz	KAR3I	Gewebe
8549	pos	III	III	pos	schwarz	KAR3I	ZVK
8569	pos	II	I	pos	pink/rot	AIT2I	ZVK
8572	neg	I	II	neg	pink/rot	AIT2I	ZVK
8599	pos	III	II	pos	schwarz	NEU12	ZVK
9042/1	pos	III	I	pos	pink/rot	CHI3	ZVK
9042/2	pos	II	I	pos	pink/rot	CHI3	ZVK
9105/1	pos	III	I	pos	pink/rot	KAR3I	ZVK
9199	pos	III	neg	neg	pink/rot	ORT03	Gewebe
9992	neg	III	I	pos	pink/rot	GHIO8	Drain/ andere Kath.
10026	pos	III	neg	pos	pink/rot	KARO3	ZVK
10160	pos	III	neg	neg	schwarz	KARI	ZVK
10199	pos	II	I	neg	pink/rot	CHH01	ZVK
10238	pos	II	neg	pos	pink/rot	CHH02	Gewebe
10247	pos	II	I	pos	pink/rot	KARI	Drain/ andere Kath.
10481	pos	III	II	pos	schwarz	KARI	Drain/ andere Kath.
10490	pos	II	neg	neg	schwarz	CHI3	ZVK
10505	neg	I	neg	neg	pink/rot	CHI1	Gewebe
10591	pos	III	NT	pos	pink/rot	HAUF1	Gewebe
10651	neg	III	I	pos	pink/rot	ORO8A	Gewebe
10716	pos	neg	II	pos	schwarz	AIT2I	Gewebe
10873	pos	neg	neg	pos	schwarz	ORT02	Implantate

<u>Nr.</u>	<u>icaA/D</u>	<u>agr</u>	<u>SCCmec</u>	<u>IS256</u>	<u>Biofilm</u>	<u>Klinik</u>	<u>Material</u>
10896	neg	II	I	neg	pink/rot	CHI11	Drain/ andere Kath.
10968	neg	II	I	neg	pink/rot	NEU12	ZVK
10975	pos	I	NT	pos	schwarz	CHI1	Gewebe
11130	neg	II	neg	neg	pink/rot	NEP7	Drain/ andere Kath.
11146	pos	II	I	neg	pink/rot	NEU14	ZVK
11205	pos	II	neg	neg	schwarz	ORT02	Implantate
11260	neg	II	I	pos	pink/rot	HAE06	ZVK
11311	neg	II	I	neg	pink/rot	CHI3	Gewebe
11315	neg	III	I	neg	pink/rot	GHI4	Gewebe
11377	pos	III	I	neg	schwarz	CHH02	Gewebe
11406	neg	II	neg	neg	pink/rot	HAE06	ZVK
11475	pos	III	II	pos	schwarz	HAE06	ZVK
11476	pos	II	I	neg	pink/rot	HAE06	ZVK
11483	neg	II	I	neg	pink/rot	KARI	Drain/ andere Kath.
11666	pos	III	neg	neg	pink/rot	NEP7	Drain/ andere Kath.
11753	pos	III	I	neg	pink/rot	CHU5	Gewebe
11892	pos	III	IV	pos	pink/rot	GHI4	ZVK
11905	pos	neg	IV	pos	pink/rot	PAEI12	Gewebe
11991	pos	II	I	pos	pink/rot	NEP7	ZVK
12060	neg	II	I	pos	pink/rot	PAEI1	ZVK
12218	pos	II	I	pos	schwarz	CHK03	ZVK
12219	neg	II	neg	neg	pink/rot	HNO2	Gewebe
12288	neg	II	I	neg	pink/rot	CHI1	Gewebe
12374	neg	II	I	pos	pink/rot	CHU5	Gewebe
12412	pos	II	I	neg	schwarz	CHI2	Gewebe
12559	pos	II	I	neg	pink/rot	ORT03	Gewebe
12633	pos	III	NT	neg	pink/rot	HAU4	Gewebe
12644	pos	III	IV	pos	schwarz	ORT03	Implantate
12697	pos	II	neg	neg	schwarz	CHN15B	Drain/ andere Kath.
12704	pos	III	IV	neg	schwarz	CHU5	Gewebe
12753	pos	neg	II	pos	schwarz	URO8B	ZVK
12759/1	pos	III	neg	pos	schwarz	ORT03	Gewebe
12759/2	pos	neg	neg	pos	schwarz	ORT03	Gewebe
12851	pos	I	III	pos	schwarz	CHUA	Gewebe

<u>Nr.</u>	<u>icaA/D</u>	<u>agr</u>	<u>SCCmec</u>	<u>IS256</u>	<u>Biofilm</u>	<u>Klinik</u>	<u>Material</u>
12855	neg	II	I	neg	pink/rot	CHI2	ZVK
12937	neg	neg	I	neg	pink/rot	CHI3	Gewebe
13096/2	neg	II	I	pos	pink/rot	URO8B	Implantate
13181	pos	neg	IV	pos	schwarz	PAEI2	Drain/ andere Kath.
13189/1	neg	II	NT	pos	pink/rot	ORT03	Implantate
13211	neg	neg	NT	neg	pink/rot	NEP7	ZVK
13354	pos	neg	III	pos	schwarz	PNE02	Gewebe
13360/1	neg	II	I	pos	pink/rot	NEP7	Drain/ andere Kath.
13601	neg	neg	I	pos	pink/rot	PAEI2	ZVK
13657	neg	III	NT	pos	pink/rot	ORTA	Gewebe
13778	pos	III	I	pos	pink/rot	CHI2	Drain/ andere Kath.
13831	neg	III	I	neg	pink/rot	HNO03	Gewebe
13870	neg	neg	neg	neg	pink/rot	CHUA	Gewebe
13880	pos	neg	NT	pos	pink/rot	ORT03	Gewebe
13881	pos	I	I	pos	schwarz	ORT03	Gewebe
13889	neg	I	I	neg	pink/rot	AIT2I	ZVK
13917	pos	III	III	pos	pink/rot	CHI1I	ZVK
13935	pos	III	neg	pos	schwarz	ORT03	Gewebe
14204/1	pos	I	I	pos	schwarz	CHI2	Drain/ andere Kath.
14204/2	pos	III	I	pos	schwarz	CHI2	Drain/ andere Kath.
14625/1	pos	II	I	neg	schwarz	KAR3I	ZVK
14628	neg	II	I	neg	pink/rot	KARI	ZVK
14934	pos	I	IV	neg	schwarz	GYN07	ZVK
15054	neg	III	I	pos	pink/rot	NEP7	ZVK
15175	neg	III	I	pos	pink/rot	CHH01	ZVK
15751	pos	III	neg	neg	schwarz	CHH02	Gewebe
15843	pos	II	neg	neg	schwarz	ORT03	Gewebe
15855	pos	I	NT	pos	pink/rot	KAR3I	ZVK
15988	pos	I	NT	pos	pink/rot	HAE06	ZVK
15994	neg	III	neg	pos	pink/rot	NEP7	Drain/ andere Kath.
16055	pos	neg	I	pos	pink/rot	AIT2I	ZVK
16061	pos	I	II	pos	pink/rot	HAE06	ZVK
16479	neg	I	neg	neg	pink/rot	CHI1I	ZVK
16539	neg	II	I	neg	pink/rot	KAR01	Gewebe

<u>Nr.</u>	<u>icaA/D</u>	<u>agr</u>	<u>SCCmec</u>	<u>IS256</u>	<u>Biofilm</u>	<u>Klinik</u>	<u>Material</u>
16706	pos	I	neg	pos	schwarz	HAE06	ZVK
16853	pos	II	neg	pos	pink/rot	URO8A	Drain/ andere Kath.
2234	pos	I	II	pos	schwarz	CHI03	BK
2300	pos	II	I	pos	pink/rot	AIT2I	BK
2413	neg	I	NT	pos	pink/rot	HAE06	BK
2414	pos	I	I	pos	pink/rot	HAE06	BK
2467	neg	I	I	neg	pink/rot	HAE06	BK
2532	neg	III	IV	pos	schwarz	HAE06	BK
2540	pos	III	neg	pos	pink/rot	CHI1	BK
2541	pos	neg	I	neg	pink/rot	ZNA	BK
3089	pos	III	NT	neg	pink/rot	CHI3	BK
3134	pos	III	III	pos	schwarz	KI	BK
3318	pos	III	III	pos	schwarz	CHI3	BK
3226	pos	III	neg	pos	pink/rot	CHI3	BK
3359	pos	III	neg	neg	schwarz	HAE06	BK
3409	pos	III	NT	neg	pink/rot	HAE06	BK
3410	pos	III	NT	neg	pink/rot	HAE06	BK
3546	pos	II	neg	neg	pink/rot	HAE06	BK
3575	pos	III	I	neg	pink/rot	GHI4	BK
3636	pos	neg	II	pos	schwarz	KAR3I	BK
3640	pos	III	I	pos	pink/rot	URO8A	BK
3685	pos	III	I	pos	pink/rot	PHO 03	BK
3694	pos	II	neg	pos	pink/rot	CHI1	BK
3792	pos	II	neg	pos	pink/rot	HAE06	BK
3798	pos	II	I	pos	pink/rot	CHITK	BK
3802	pos	III	I	pos	pink/rot	CHITK	BK
3814	pos	III	I	pos	pink/rot	PAE12	BK
3857	pos	II	neg	pos	pink/rot	HAE06	BK
3872	pos	III	II	pos	schwarz	PAES1	BK
3974	pos	III	NT	neg	schwarz	HAE06	BK
3975	pos	III	NT	neg	schwarz	HAE06	BK
4020/1	pos	III	III	neg	pink/rot	CHI1	BK
4020/2	pos	I	III	neg	pink/rot	CHI1	BK
4062	pos	I	III	pos	pink/rot	HAE06	BK

<u>Nr.</u>	<u>icaA/D</u>	<u>agr</u>	<u>SCCmec</u>	<u>IS256</u>	<u>Biofilm</u>	<u>Klinik</u>	<u>Material</u>
4087	neg	I	I	neg	pink/rot	END11	BK
4088	pos	III	I	neg	pink/rot	2NE14	BK
4148	pos	neg	III	neg	pink/rot	CHI1	BK
4152	neg	I	neg	neg	pink/rot	CHITK	BK
4227	pos	III	neg	neg	pink/rot	HAE06	BK
4278/1	pos	I	III	neg	pink/rot	CHI1	BK
4311	neg	III	NT	neg	pink/rot	STRO1	BK
4361/2	pos	I	NT	pos	schwarz	CHIA	BK
4367/2	neg	II	neg	neg	pink/rot	PHO03	BK
4404	pos	II	I	neg	pink/rot	STRO1	BK
4444	pos	I	II	pos	pink/rot	HAE06	BK
4458	pos	II	NT	pos	schwarz	CHI1I	BK
4483	pos	III	NT	neg	schwarz	CHI1	BK
4689	pos	III	II	neg	schwarz	CHI1I	BK
4745	neg	III	NT	neg	pink/rot	HAE06	BK
4746	neg	III	NT	neg	pink/rot	HAE06	BK
4837	pos	III	I	neg	pink/rot	CHI2	Bk
4840	neg	II	III	neg	pink/rot	HAE06	BK
5416	neg	I	I	neg	pink/rot	CHI1I	BK
5799	pos	II	NT	pos	pink/rot	AIT2I	BK
5930	neg	I	neg	neg	pink/rot	KAR3I	BK
5948	pos	III	III	pos	pink/rot	ChI1I	BK
5950	pos	III	III	pos	schwarz	CHI1I	BK
6010	neg	II	I	neg	pink/rot	CHI3	BK
6232	neg	II	I	pos	pink/rot	CHI1	BK
6282	pos	III	NT	neg	schwarz	AIT2I	BK
268	neg	neg	neg	neg	pink/rot	PAEFG	BK
275	pos	I	II	pos	schwarz	KAR3I	BK
387	neg	I	neg	neg	pink/rot	CHI3	BK
424	pos	III	II	neg	schwarz	AIT2I	BK
505	neg	III	I	neg	pink/rot	CHI1I	BK
665	neg	III	I	neg	pink/rot	PAEI2	BK

Anlage 1: Auflistung der Isolate mit Angabe des Herkunftsortes, der Ergebnisse der PCR sowie der Kultivierung auf Kongorot-Agar

Nr.	icaA/D	agr	SCCmec	IS256	Biofilm	PEN	OXA	SXT	TET	ERY	GEN	CIP	VAN	CLI
6347	pos	III	IV	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	I	R	S	R
6363/2	neg	III	I	neg	pink/rot	R	R	I	I	R	R	R	S	R
6507/1	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	R	S	R
6507/2	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	R	S	R
6533	pos	I	II	pos	pink/rot	R	R	R	R	R	R	R	S	R
6534	pos	I	II	pos	schwarz	R	R	R	R	R	R	R	S	R
6607	neg	II	NT	pos	pink/rot	R	R	R	S	R	R	R	S	R
6687	pos	II	neg	pos	schwarz	S	S	R	S	R	R	R	S	R
6779	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	I	S	R
6816	pos	neg	I	neg	pink/rot	R	S	S	S	S	S	S	S	S
6818	pos	III	II	pos	schwarz	R	R	R	S	R	R	R	S	R
6820	pos	II	neg	pos	schwarz	S	S	I	S	R	I	R	S	R
6821	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	I	S	S	S	S	S
6836	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	I	I	R	R	R	S	R
6947	pos	neg	neg	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
6954/1	pos	II	II	pos	schwarz	R	R	R	I	S	R	R	S	S
6973/1	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	I	S	R
6973/2	pos	II	II	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
7066/1	neg	II	neg	neg	pink/rot	R	R	S	I	R	R	R	S	R
7066/2	neg	III	I	neg	pink/rot	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7086	neg	neg	neg	pos	pink/rot	R	S	S	I	S	S	S	S	S
7087	neg	I	neg	neg	pink/rot	R	S	S	I	S	S	S	S	S
7129	neg	II	neg	neg	pink/rot	R	S	S	S	S	S	S	S	S
7180/1	pos	I	II	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
7223	pos	neg	IV	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	R	R	S	R
7702	neg	I	neg	neg	pink/rot	S	S	I	I	S	S	S	S	S
7761	neg	I	I	neg	pink/rot	R	R	I	R	R	R	R	S	R
7816	neg	neg	NT	pos	schwarz	R	R	I	S	R	R	R	S	R
7830	neg	I	I	pos	pink/rot	R	R	S	I	R	R	S	S	R
7832/1	neg	neg	I	pos	pink/rot	R	R	S	I	R	R	S	S	R
7835	neg	III	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	I	S	R
7947	neg	neg	I	neg	pink/rot	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7981	neg	I	I	neg	pink/rot	R	R	I	R	R	R	R	S	R
8145	neg	II	neg	neg	pink/rot	R	S	S	I	R	S	S	S	R

Nr.	icaA/D	agr	SCCmec	IS256	Biofilm	PEN	OXA	SXT	TET	ERY	GEN	CIP	VAN	CLI
8210	pos	I	IV	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
8234	pos	II	neg	pos	pink/rot	R	S	S	R	S	S	S	S	S
8271	pos	III	I	pos	schwarz	R	R	S	I	R	R	R	S	R
8305	pos	neg	II	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	R	R	S	R
8306	pos	I	II	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
8307	pos	I	II	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
8308	pos	III	II	pos	schwarz	R	R	R	I	S	R	R	S	S
8375	neg	II	neg	neg	pink/rot	R	S	S	I	S	S	S	S	S
8395/1	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	R	S	R
8395/2	neg	II	I	neg	schwarz	R	R	S	S	R	S	R	S	R
8466	pos	III	II	pos	schwarz	R	R	S	S	R	R	S	S	R
8549	pos	III	III	pos	schwarz	R	R	R	R	R	R	R	S	R
8569	pos	II	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	S	R	S	R
8572	neg	I	II	neg	pink/rot	R	R	S	I	R	R	R	S	R
8599	pos	III	II	pos	schwarz	R	R	R	I	R	S	S	S	R
9042/1	pos	III	I	pos	pink/rot	R	R	I	R	R	R	I	S	R
9042/2	pos	II	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	I	S	R
9105/1	pos	III	I	pos	pink/rot	R	R	S	I	R	R	R	S	R
9199	pos	III	neg	neg	pink/rot	R	S	R	R	R	S	R	S	R
9992	neg	III	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	I	S	R
10026	pos	III	neg	pos	pink/rot	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10160	pos	III	neg	neg	schwarz	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10199	pos	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	I	S	R
10238	pos	II	neg	pos	pink/rot	R	S	R	S	S	S	S	S	S
10247	pos	II	I	pos	pink/rot	R	R	I	S	R	S	R	S	R
10481	pos	III	II	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
10490	pos	II	neg	neg	schwarz	R	R	S	S	S	S	S	S	S
10505	neg	I	neg	neg	pink/rot	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10591	pos	III	NT	pos	pink/rot	R	R	I	S	R	S	S	S	R
10651	neg	III	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	R	S	R
10716	pos	neg	II	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
10873	pos	neg	neg	pos	schwarz	R	S	S	I	R	R	R	S	R
10896	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	R	S	R
10968	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	I	S	R

Nr.	icaA/D	agr	SCCmec	IS256	Biofilm	PEN	OXA	SXT	TET	ERY	GEN	CIP	VAN	CLI
10975	pos	I	NT	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
11130	neg	II	neg	neg	pink/rot	R	S	I	I	S	S	S	S	S
11146	pos	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	R	S	R
11205	pos	II	neg	neg	schwarz	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11260	neg	II	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	R	S	R
11311	neg	II	I	neg	pink/rot	R	S	S	I	R	S	S	S	R
11315	neg	III	I	neg	pink/rot	R	R	I	I	R	R	R	S	R
11377	pos	III	I	neg	schwarz	R	R	S	I	R	S	R	S	R
11406	neg	II	neg	neg	pink/rot	R	S	S	R	S	S	S	S	S
11475	pos	III	II	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
11476	pos	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	R	S	R
11483	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	I	I	S	S	S	S	S
11666	pos	III	neg	neg	pink/rot	R	S	S	S	R	S	S	S	R
11753	pos	III	I	neg	pink/rot	R	R	S	I	R	S	R	S	R
11892	pos	III	IV	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	R	R	S	R
11905	pos	neg	IV	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	R	R	S	R
11991	pos	II	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	R	S	R
12060	neg	II	I	pos	pink/rot	R	R	S	R	R	R	S	S	R
12218	pos	II	I	pos	schwarz	R	R	S	I	R	R	R	S	R
12219	neg	II	neg	neg	pink/rot	R	S	S	S	S	S	S	S	S
12288	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	R	S	R
12374	neg	II	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	R	S	R
12412	pos	II	I	neg	schwarz	R	R	S	I	S	S	R	S	S
12559	pos	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	I	S	R
12633	pos	III	NT	neg	pink/rot	R	R	S	I	R	S	S	S	R
12644	pos	III	IV	pos	schwarz	R	R	S	I	R	R	R	S	R
12697	pos	II	neg	neg	schwarz	R	S	S	R	S	S	S	S	S
12704	pos	III	IV	neg	schwarz	R	R	S	I	R	S	S	S	R
12753	pos	neg	II	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
12759/1	pos	III	neg	pos	schwarz	R	S	R	I	S	S	R	S	S
12759/2	pos	neg	neg	pos	schwarz	R	S	R	I	R	I	R	S	R
12851	pos	I	III	pos	schwarz	R	R	R	S	S	R	R	S	S
12855	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	S	S	R	S	S
12937	neg	neg	I	neg	pink/rot	R	R	S	R	R	R	R	S	R

Nr.	icaA/D	agr	SCCmec	IS256	Biofilm	PEN	OXA	SXT	TET	ERY	GEN	CIP	VAN	CLI
13096/2	neg	II	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	R	S	R
13181	pos	neg	IV	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
13189/1	neg	II	NT	pos	pink/rot	R	S	S	S	S	S	R	S	S
13211	neg	neg	NT	neg	pink/rot	R	R	I	R	R	R	S	S	R
13354	pos	neg	III	pos	schwarz	R	R	R	I	S	R	R	S	S
13360/1	neg	II	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	I	S	R
13601	neg	neg	I	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	R	R	S	R
13657	neg	III	NT	pos	pink/rot	R	R	R	S	R	R	S	S	R
13778	pos	III	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	I	S	R
13831	neg	III	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	S	S	R	S	S
13870	neg	neg	neg	neg	pink/rot	S	S	S	I	S	S	S	S	S
13880	pos	neg	NT	pos	pink/rot	R	R	R	S	R	S	S	S	R
13881	pos	I	I	pos	schwarz	R	R	R	S	R	S	S	S	R
13889	neg	I	I	neg	pink/rot	R	R	I	R	R	R	R	S	R
13917	pos	III	III	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	R	R	S	R
13935	pos	III	neg	pos	schwarz	R	S	S	I	R	R	R	S	R
14204/1	pos	I	I	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
14204/2	pos	III	I	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
14625/1	pos	II	I	neg	schwarz	R	R	S	S	R	S	I	S	R
14628	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	R	S	S	R	S	S
14934	pos	I	IV	neg	schwarz	R	R	S	R	R	S	S	S	R
15054	neg	III	I	pos	pink/rot	R	R	S	S	R	R	I	S	R
15175	neg	III	I	pos	pink/rot	R	R	I	I	R	R	I	S	R
15751	pos	III	neg	neg	schwarz	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15843	pos	II	neg	neg	schwarz	R	S	S	I	S	S	S	S	S
15855	pos	I	NT	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	R	R	S	R
15988	pos	I	NT	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	R	R	S	R
15994	neg	III	neg	pos	pink/rot	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16055	pos	neg	I	pos	pink/rot	R	R	S	R	R	I	I	S	R
16061	pos	I	II	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	S	S	S	R
16479	neg	I	neg	neg	pink/rot	S	S	S	I	S	S	S	S	S
16539	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	R	S	R
16706	pos	I	neg	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
16853	pos	II	neg	pos	pink/rot	R	S	I	I	S	S	R	S	S

Nr.	icaA/D	agr	SCCmec	IS256	Biofilm	PEN	OXA	SXT	TET	ERY	GEN	CIP	VAN	CLI
2234	pos	I	II	pos	schwarz	R	R	R	n.g.	R	R	R	S	R
2300	pos	II	I	pos	pink/rot	R	R	n.g.	n.g.	R	R	R	S	n.g.
2413	neg	I	NT	pos	pink/rot	R	R	S	I	R	S	S	S	R
2414	pos	I	I	pos	pink/rot	R	R	n.g.	R	R	R	R	S	R
2467	neg	I	I	neg	pink/rot	R	R	n.g.	R	R	R	R	S	R
2532	neg	III	IV	pos	schwarz	R	R	n.g.	R	R	n.g.	R	S	n.g.
2540	pos	III	neg	pos	pink/rot	R	S	n.g.	I	S	S	R	S	S
2541	pos	neg	I	neg	pink/rot	R	R	n.g.	S	R	R	R	S	R
3089	pos	III	NT	neg	pink/rot	R	R	n.g.	S	R	S	S	S	R
3134	pos	III	III	pos	schwarz	R	R	R	I	R	S	R	S	R
3318	pos	III	III	pos	schwarz	R	R	n.g.	n.g.	R	R	R	S	R
3226	pos	III	neg	pos	pink/rot	S	S	n.g.	S	S	S	S	S	S
3359	pos	III	neg	neg	schwarz	S	S	S	I	S	S	S	S	S
3409	pos	III	NT	neg	pink/rot	R	R	S	I	R	S	S	S	R
3410	pos	III	NT	neg	pink/rot	R	R	S	I	R	S	S	S	R
3546	pos	II	neg	neg	pink/rot	R	S	n.g.	R	S	S	S	S	S
3575	pos	III	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	S	S	R	S	R
3636	pos	neg	II	pos	schwarz	R	R	n.g.	S	R	R	R	S	R
3640	pos	III	I	pos	pink/rot	R	R	n.g.	R	R	S	R	S	R
3685	pos	III	I	pos	pink/rot	R	R	S	I	R	R	S	S	R
3694	pos	II	neg	pos	pink/rot	R	S	S	S	R	S	S	S	R
3792	pos	II	neg	pos	pink/rot	R	S	n.g.	I	S	S	S	S	S
3798	pos	II	I	pos	pink/rot	R	R	n.g.	S	S	R	R	S	S
3802	pos	III	I	pos	pink/rot	R	R	n.g.	S	S	R	R	S	S
3814	pos	III	I	pos	pink/rot	R	R	S	I	R	R	S	S	R
3857	pos	II	neg	pos	pink/rot	R	S	n.g.	I	R	S	S	S	R
3872	pos	III	II	pos	schwarz	R	R	n.g.	I	S	R	R	S	S
3974	pos	III	NT	neg	schwarz	R	R	S	I	R	S	S	S	R
3975	pos	III	NT	neg	schwarz	R	R	S	I	R	S	S	S	R
4020/1	pos	III	III	neg	pink/rot	R	R	n.g.	I	I	S	R	S	S
4020/2	pos	I	III	neg	pink/rot	R	R	n.g.	S	S	S	R	S	S
4062	pos	I	III	pos	pink/rot	R	R	S	I	S	R	R	S	S
4087	neg	I	I	neg	pink/rot	R	R	S	I	R	R	R	S	R
4088	pos	III	I	neg	pink/rot	R	R	S	S	R	S	I	S	R

Nr.	icaA/D	agr	SCCmec	IS256	Biofilm	PEN	OXA	SXT	TET	ERY	GEN	CIP	VAN	CLI
4148	pos	neg	III	neg	pink/rot	R	R	I	n.g.	S	S	R	S	S
4152	neg	I	neg	neg	pink/rot	S	S	n.g.	S	R	S	S	S	n.g.
4227	pos	III	neg	neg	pink/rot	R	S	S	R	S	S	S	S	S
4278/1	pos	I	III	neg	pink/rot	R	R	n.g.	I	S	S	R	S	S
4311	neg	II	NT	neg	pink/rot	R	R	n.g.	S	R	S	R	S	R
4361/2	pos	I	NT	pos	schwarz	R	R	n.g.	I	S	R	R	S	S
4367/2	neg	II	neg	neg	pink/rot	R	S	n.g.	S	S	S	S	S	S
4404	pos	II	I	neg	pink/rot	R	R	n.g.	S	R	S	R	S	R
4444	pos	I	II	pos	pink/rot	R	R	R	I	R	S	S	S	R
4458	pos	II	NT	pos	schwarz	R	R	I	R	R	R	R	S	R
4483	pos	III	NT	neg	schwarz	R	R	R	R	R	S	R	S	R
4689	pos	III	II	neg	schwarz	R	R	n.g.	I	R	R	R	S	R
4745	neg	III	NT	neg	pink/rot	R	R	n.g.	I	R	S	S	S	R
4746	neg	III	NT	neg	pink/rot	R	R	n.g.	I	R	S	S	S	R
4837	pos	III	I	neg	pink/rot	R	R	n.g.	S	R	S	S	S	n.g.
4840	neg	II	III	neg	pink/rot	R	R	n.g.	I	R	S	S	S	R
5416	neg	I	I	neg	pink/rot	R	R	S	R	R	R	R	S	n.g.
5799	pos	II	NT	pos	pink/rot	R	S	S	S	R	R	R	S	R
5930	neg	I	neg	neg	pink/rot	S	S	n.g.	S	S	S	S	S	S
5948	pos	III	III	pos	pink/rot	R	R	n.g.	S	R	R	R	S	R
5950	pos	III	III	pos	schwarz	R	R	R	S	R	R	R	S	R
6010	neg	II	I	neg	pink/rot	R	R	n.g.	S	S	S	R	S	S
6232	neg	II	I	pos	pink/rot	R	R	n.g.	S	R	R	R	S	n.g.
6282	pos	III	NT	neg	schwarz	R	R	n.g.	R	R	S	S	S	n.g.
268	neg	neg	neg	neg	pink/rot	R	S	n.g.	S	S	S	S	S	S
275	pos	I	II	pos	schwarz	R	R	R	I	R	R	R	S	R
387	neg	I	neg	neg	pink/rot	R	R	R	R	S	R	n.g.	S	n.g.
424	pos	III	II	neg	schwarz	R	R	S	S	S	S	S	S	S
505	neg	III	I	neg	pink/rot	R	R	n.g.	S	R	S	R	S	R
665	neg	III	I	neg	pink/rot	R	R	S	R	R	S	R	S	R

Anlage 2: Auflistung der Isolate mit den Ergebnissen der Resistenzbestimmung, der PCR und der Kultivierung auf Kongorot-Agar

<u>Nr.</u>	<u>icaA/D</u>	<u>agr</u>	<u>SCCmec</u>	<u>IS256</u>	<u>Biofilm</u>	<u>ST</u>	<u>Material</u>
2300	pos	II	I	pos	pink/rot	5	BK
2414	pos	I	I	pos	pink/rot	10	BK
2540	pos	III	Neg	pos	pink/rot	57,154,172	BK
3089	pos	III	NT	neg	pink/rot	130	BK
3409	pos	III	NT	neg	pink/rot	59	BK
3636	pos	neg	II	pos	schwarz	2	BK
3798	pos	II	NT	pos	pink/rot	6	BK
3857	pos	II	neg	pos	pink/rot	59	BK
3974	pos	III	NT	neg	schwarz	48	BK
3975	pos	III	NT	neg	schwarz	48	BK
4020/2	pos	I	III	neg	pink/rot	242	BK
4062	pos	I	III	pos	pink/rot	2	BK
4152	neg	I	neg	neg	pink/rot	130	BK
4311	neg	II	NT	neg	pink/rot	5	BK
4367/2	neg	II	neg	neg	pink/rot	32	BK
4458	pos	II	NT	pos	schwarz	23	BK
4689	pos	III	II	neg	schwarz	2	BK
4745	neg	III	NT	neg	pink/rot	59	BK
4840	neg	II	III	neg	pink/rot	21	BK
5416	neg	I	I	neg	pink/rot	10	BK
5948	pos	III	III	pos	pink/rot	2	BK
5950	pos	III	III	pos	schwarz	2	BK
6010	neg	II	I	neg	pink/rot	5	BK
275	pos	I	II	pos	schwarz	2	BK
387	neg	I	neg	neg	pink/rot	21	BK
665	neg	III	I	neg	pink/rot	5	BK
6363/2	neg	III	I	neg	pink/rot	10	Drain/andere Kath.
6818	pos	III	II	pos	schwarz	43	Implantate
8271	pos	III	I	pos	schwarz	135	Gewebe
8308	pos	III	II	pos	schwarz	135	Drain/andere Kath.
8549	pos	III	III	pos	schwarz	135	ZVK
9105/1	pos	III	I	pos	pink/rot	23	ZVK
10481	pos	III	II	pos	schwarz	242	Drain/andere Kath.
10651	neg	III	I	pos	pink/rot	130	Gewebe

<u>Nr.</u>	<u>icaA/D</u>	<u>agr</u>	<u>SCCmec</u>	<u>IS256</u>	<u>Biofilm</u>	<u>ST</u>	<u>Material</u>
11315	neg	III	I	neg	pink/rot	10	Gewebe
11475	pos	III	II	pos	schwarz	242	ZVK
11892	pos	III	IV	pos	pink/rot	242	ZVK
12644	pos	III	IV	pos	schwarz	23	Implantate
13917	pos	III	III	pos	pink/rot	43	ZVK
14204/2	pos	III	I	pos	schwarz	242	Drain/andere Kath.

Anlage 3: Auflistung der Isolate mit den Ergebnissen der PCR sowie der Sequenzierung

