

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Dirk Schlüter)

**PHÄNO- UND GENOTYPISCHE UNTERSUCHUNGEN VON
METHICILLIN-SENSIBLEN UND -RESISTENTEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS-ISOLATEN AUS PANAMA**

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
aus
Magdeburg

Astrid Elke Heeren
Emden/Ostfriesland
2015

...für meine Eltern

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Heeren, Astrid Elke:

Phäno- und genotypische Untersuchungen von Methicillin-sensiblen und -resistenten *Staphylococcus aureus*-Isolaten aus Panama. - 2015. - 64 Bl. : 21 Abb., 22 Tab.

Kurzreferat

Infektionskrankheiten breiten sich weltweit aus. *Staphylococcus aureus* ist einer der bedeutendsten humanpathogenen Erreger und Auslöser nosokomialer Infektionen. Aufgrund der Tatsache, dass in Panama bisher keine populationsgenetischen sowie phylogenetischen Arbeiten existieren, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die *S. aureus*-Isolate aus Panama phäno- und genotypisch zu charakterisieren. Aus diversen klinischen Abstrichmaterialien des Universitätsklinikums Hospital Santo Tomás in Panama City konnten von 2008 bis 2010 119 *S. aureus*-Isolate gesammelt werden. Sie wurden biochemisch identifiziert und ihre Antibiotika-Empfindlichkeit analysiert. Sowohl die Staphylokokken-Enterotoxingene als auch das Panton-Valentine-Leukozidin-Toxingen (PVL), die *agr*-Gruppenspezifität und bei Methicillin-Resistenz das *mecA*-Gen hinsichtlich der SCC*mec*-Typisierung wurden untersucht. Die klonale Zugehörigkeit von Methicillin-sensiblen (MSSA) und -resistenten *S. aureus*-Isolaten (MRSA) wurde mittels *spa*-Gen-Typisierung und Multilocus-Sequenztyp-Analyse (MLST) charakterisiert. Von den 119 Isolaten waren 101 Methicillin-resistent (MRSA). Die 18 MSSA-Isolate waren hauptsächlich resistent zu 78% gegenüber Penicillin bzw. zu 27% gegenüber Erythromycin, wohingegen die MRSA-Isolate eine zusätzliche Resistenz gegenüber Fusidinsäure, Erythromycin, Clindamycin, Chinolonen und Tobramycin aufwiesen. Ein Siebtel der MRSA-Isolate waren positiv für das *tst*-Gen und ca. zwei Drittel für das PVL-Gen, wohingegen 80% der MSSA-Isolate das PVL-Gen trugen und ungefähr ein Drittel das *tst*-Gen. Ergebnisse der Genotypisierung der MSSA-Isolate zeigten eine Häufung von der klonalen Linie ST1, bei den MRSA-Isolaten war die Mehrzahl der klonalen Linie ST8 und ST45 zuzuordnen.

Schlüsselwörter

Staphylococcus aureus, MRSA, Panama, Genotypisierung, Phänotypisierung, SCC*mec*, MLST, *spa*

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	X
TABELLENVERZEICHNIS.....	XI
1. EINLEITUNG	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	1
1.2 <i>S. aureus</i>-vermittelte Erkrankungen	2
1.3 Die wichtigsten von <i>S. aureus</i> produzierten Virulenzfaktoren	3
1.3.1 Zellwandständige und sezernierte Virulenzfaktoren	3
1.3.2 Hämolyse und Leukozidine	4
1.3.3 Staphylokokken-Enterotoxine (SE)	5
1.3.4 <i>Toxic-Shock-Syndrome-Toxin</i> (TSST-1)	6
1.4 Das Regulatorgen <i>agr</i>	6
1.5 Antibiotika-Resistenz von <i>S. aureus</i>	8
1.5.1 Das <i>mecA</i> -Gen und sein Penicillin-Binde-Protein 2a (PBP 2a)	8
1.5.2 SCC <i>mec</i> -Typ	9
1.6 Vorkommen von MRSA	9
1.7 Feintypisierungsverfahren von <i>S. aureus</i>-Isolaten	11
1.7.1 Multilocus-Sequenzanalyse	11
1.7.2 <i>spa</i> -Typisierung	12
1.8 Aufgabenstellung	13
2. MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 Geräte.....	14
2.2 Plastikmaterialien und Zubehör	14
2.3 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Puffer, Lösungen und Kits	15
2.3.1 Enzyme und Reagenzien.....	15
2.3.2 Chemikalien und Lösungen	15
2.3.3 Käuflich erworbene Kits	15
2.3.4 Puffer und Lösungen	15
2.4 Bakterien und Kulturmedien.....	16
2.4.1 <i>S. aureus</i> -Isolate aus Panama.....	16
2.4.2 Kulturmedien	16

2.5 Phänotypische Methoden	16
2.5.1 Kultivieren von <i>S. aureus</i>	16
2.5.2 Identifizierung der <i>S. aureus</i> -Phänotypen	17
2.6 Genotypische Methoden	18
2.6.1 DNA-Isolation	18
2.6.2 Messung der DNA-Konzentration	19
2.6.3 PCR – Polymerasekettenreaktion	19
2.6.4 Genexpressionsanalyse der Virulenzdeterminanten von <i>S. aureus</i>	20
2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel).....	21
2.6.6 <i>agr</i> -Typisierung von <i>S. aureus</i>	22
2.6.7 Multilocus-Sequenzanalyse und <i>spa</i> -Typisierung	23
2.6.8 SCC <i>mec</i> -Typisierung von MRSA.....	25
2.6.9 Aufreinigung von PCR-Produkten mit QIAquick PCR Purification Kit.....	26
2.6.10 DNA Cycle-Sequenzierung von PCR-Produkten.....	26
2.6.11 Kapillarelektrophorese für die DNA-Sequenzierung	28
2.7 Auswertung der Sequenzen von MLST und <i>spa</i>	28
2.7.1 Multilocus-Sequenz-Auswertung.....	28
2.7.1.1 Erstellung von Stammbäumen – Phylogenie	29
2.7.2 <i>spa</i> -Cycle-Sequenzierung und Auswertung	29
2.8 Statistische Analysen	30
3. ERGEBNISSE	31
3.1 Verteilung der <i>S. aureus</i>-Isolate Panamas auf MRSA und MSSA	31
3.2 Antimikrobielle Resistenzen der MSSA- und MRSA-Isolate	31
3.3 Resistenzphänotypen der <i>S. aureus</i>-Isolate	32
3.4 Analyse der <i>agr</i>-Typisierung der <i>S. aureus</i>-Isolate	33
3.5 Analyse der Toxingene der <i>S. aureus</i>-Isolate	34
3.6 Klonale Verteilung der <i>S. aureus</i>-Isolate	37
3.6.1 Klonale Verteilung der MRSA-Isolate.....	37
3.6.2 Klonale Verteilung der MSSA-Isolate.....	39
3.7 Zuordnung von Sequenztyp zu <i>agr</i>-Gruppe	40
3.8 <i>spa</i>-Typisierung der <i>S. aureus</i>-Isolate	42
3.8.1 <i>spa</i> -Typisierung der MRSA-Isolate	42
3.8.2 <i>spa</i> -Typisierung der MSSA-Isolate	45

3.9	Analyse des SCCmec-Typs für die MRSA-Isolate	46
3.10	Phylogenetische Analyse und Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den einzelnen MSSA- und MRSA-Isolaten	50
4.	DISKUSSION.....	52
4.1	Antibiotika-Resistenz von <i>Staphylococcus aureus</i> in Panama.....	52
4.2	Analyse der Toxingene	53
4.3	agr-Gruppenspezifitäten	54
4.4	Zuordnung der MRSA-agr-Gruppen zu den Toxingenprofilen	55
4.5	SCCmec-Typen der MRSA-Isolate.....	55
4.6	Zusammenhang von SCCmec-Typ und Antibiotikaresistenz.....	56
4.7	Die Beziehung zwischen SCCmec-Typ und agr-Gruppe	57
4.8	Die Bewertung des Sequenztyps (ST).....	58
4.9	Die Verwandtschaftsbeziehungen der <i>S. aureus</i> -Isolate Panamas.....	61
4.10	Ausblick	62
5.	ZUSAMMENFASSUNG	64
6.	LITERATURVERZEICHNIS	65
	DANKSAGUNG	73
	EHRENERKLÄRUNG	74
	LEBENS LAUF	75
	ANHANG.....	76

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
AIP	<i>autoinducing peptide</i>
<i>arcC</i>	Carbamatkinase
<i>aroE</i>	Shikimatdehydrogenase
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CA	<i>community-acquired</i>
°C	Grad Celsius
CLI	Clindamycin
DLV	<i>double locus variants</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	äquimolares Gemisch der Nukleotide dATP, dTTP, dGTP und dCTP
ERY	Erythromycin
etc.	<i>et cetera</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
for	<i>forward</i> (engl.: vorwärts)
FOS	Fosfomycin
FUS	Fusidinsäure
g	Gramm
GEN	Gentamicin
<i>glpF</i>	Glycerinkinase
<i>gmk</i>	Guanylatkinase
HA	<i>hospital-acquired</i>
HCl	Salzsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
l	Liter
LEV	Levofloxacin
LIN	Linezolid
μ	Micro (10 ⁻⁶), z. B. μl, μg
m	Milli (10 ⁻³), z. B. ml, mg, mmol, mm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

min	Minute
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mol	Mol = Stoffmenge
MOX	Moxifloxacin
MRSA	Methicillin-resistente(r) <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensible(r) <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Nano (10^{-9}), z. B. ng, nm
<i>n</i>	Anzahl
neg	negative
OXA	Oxacillin
p	Pico (10^{-12}), z. B. pmol
PBP (2a)	Penicillin-Binde-Protein (2a)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEN	Penicillin
<i>pta</i>	Phosphatacetyltransferase
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
rev	<i>reverse</i> (engl.: rückwärts)
RIF	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s. o.	siehe oben
SE (z. B. sea)	Staphylokokken-Enterotoxine (z. B. <i>staphylococcal enterotoxin A</i>)
SCC <i>mec</i>	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SLV	<i>single locus variants</i>
<i>spa</i>	Gen des <i>Staphylococcus aureus</i> -Proteins A
SSSS	<i>Staphylococcal Scalded Skin Syndrome</i>
SSTI	<i>skin and soft tissue infection</i>
ST	<i>sequence type</i> (Sequenztyp nach MLST)
SXT	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol
Tab.	Tabelle
TET	Tetrazyklin
TOB	Tobramycin
<i>tpi</i>	Triosephosphatisomerase
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSS	<i>Toxic Shock Syndrome</i>

TSST-1	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin 1</i>
<i>tst</i>	Gen für <i>Toxic Shock Syndrome Toxin 1</i>
u	<i>unified atomic mass unit</i>
u. a.	unter anderem
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VRSA	Vancomycin-resistente(r) <i>Staphylococcus aureus</i>
vs.	<i>versus</i>
<i>yqiL</i>	Acetyl-CoA-Acetyltransferase
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Columbia-Blut-Agar mit <i>S. aureus</i> -Kolonien	2
Abbildung 2:	Struktur von <i>S. aureus</i> mit Zellwandaufbau	4
Abbildung 3:	Aufbau des <i>agr</i> -Regulator-Systems.....	7
Abbildung 4:	Weltweite Verteilung von HA-MRSA.....	10
Abbildung 5:	Schema einer VITEK®2-Identifizierungskarte	17
Abbildung 6:	Verteilung der Methicillin-empfindlichen (MSSA) sowie -resistenten (MRSA) <i>S. aureus</i> -Isolate Panamas.....	31
Abbildung 7:	Agarose-Gelelektrophorese; Nachweis von <i>agr</i> -Gruppe I und III.....	33
Abbildung 8:	Agarose-Gelelektrophorese; Nachweis von <i>sea</i> , <i>seb</i> und <i>sec</i>	34
Abbildung 9:	Agarose-Gelelektrophorese; Nachweis von <i>see</i> und <i>sei</i>	34
Abbildung 10:	Agarose-Gelelektrophorese; Nachweis von <i>hlgA</i> , <i>hlgB</i> und <i>lukE</i>	35
Abbildung 11:	Agarose-Gelelektrophorese; Nachweis von <i>luk-PV</i>	35
Abbildung 12:	<i>spa</i> -Typ t004	43
Abbildung 13:	<i>spa</i> -Typ t008	43
Abbildung 14:	<i>spa</i> -Typ t148	43
Abbildung 15:	<i>spa</i> -Typ t443	44
Abbildung 16:	<i>spa</i> -Typ t216 und <i>spa</i> -Typ t444.....	44
Abbildung 17:	<i>spa</i> -Typ t045	45
Abbildung 18:	<i>spa</i> -Typ t127	46
Abbildung 19:	<i>spa</i> -Typ t189	46
Abbildung 20:	Agarose-Gelelektrophorese; Nachweis von SCC <i>mec</i> -Typ I und IV.....	47
Abbildung 21:	Dendrogramm zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft bzw. der klonalen Beziehungen der detektierten MSSA- und MRSA-Isolate aus Panama	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	PCR-Parameter zur Detektion von Virulenzgenen (Enterotoxine, Hämolysine, Leukozidine) von <i>S. aureus</i>	20
Tabelle 2:	Oligonukleotide zur Detektion Virulenz-assoziiierter Gene	21
Tabelle 3:	Oligonukleotide zur Detektion der <i>agr</i> -Gruppen I-IV	23
Tabelle 4:	Oligonukleotide zur Genotypisierung von <i>S. aureus</i>	24
Tabelle 5:	PCR-Parameter zur Detektion von <i>housekeeping genes</i> von <i>S. aureus</i>	24
Tabelle 6:	Oligonukleotide zur <i>SCCmec</i> -Typisierung von <i>S. aureus</i>	25
Tabelle 7:	Antibiotika-Resistenzen der MSSA- und MRSA-Isolate	32
Tabelle 8:	Antibiotika-Resistenzphänotypen der MSSA-Isolate.....	33
Tabelle 9:	Die wichtigsten Toxingen-Profile der MRSA-Isolate aus Panama.....	36
Tabelle 10:	Einteilung der MSSA-Isolate aus Panama in Toxingen-Profile	37
Tabelle 11:	Resistenzphänotypen der detektierten MRSA-Sequenztypen.....	38
Tabelle 12:	Abhängigkeiten von Resistenzphänotyp-Gruppen zu ST-Gruppe der detektierten MRSA-Isolate.	39
Tabelle 13:	Resistenzphänotypen der detektierten MSSA-Sequenztypen	39
Tabelle 14:	Abhängigkeiten von Resistenzphänotypen zu ST-Gruppe der detektierten MSSA-Isolate.....	40
Tabelle 15:	Analyse des <i>agr</i> -Locus für die ermittelten MRSA-Sequenztypen.....	40
Tabelle 16:	Analyse des <i>agr</i> -Locus für die ermittelten MSSA-Sequenztypen.....	41
Tabelle 17:	Zuordnung der detektierten <i>spa</i> -Typen zu den jeweiligen nachgewiesenen MRSA-Sequenztypen	42
Tabelle 18:	Zuordnung der MSSA-Sequenztypen zu den ermittelten <i>spa</i> -Typen	45
Tabelle 19:	Zuordnung der MRSA-Resistenzphänotypen zu <i>SCCmec</i> und <i>agr</i>	48
Tabelle 20:	Abhängigkeiten zwischen Resistenzphänotyp-Gruppen und <i>SCCmec</i> -Typ oder <i>agr</i> -Gruppe der MRSA-Isolate.....	49
Tabelle 21:	Abhängigkeiten zwischen <i>SCCmec</i> und <i>agr</i> der MRSA-Isolate.	49
Tabelle 22:	Zuordnung der Toxingenexpression zu den nachgewiesenen <i>SCCmec</i> -Typen und deren Abhängigkeiten.....	50

1. Einleitung

Weltweit sind Infektionskrankheiten auf dem Vormarsch. Zu den bedeutendsten humanpathogenen Erregern und Auslösern nosokomialer Infektionen gehört *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Der Begriff der nosokomialen Infektion beschreibt dabei eine Infektion, die erst nach 48 Stunden nach stationärer Aufnahme auftritt und somit im Krankenhaus erworben wurde (*hospital-acquired* = HA). Doch nicht alleine die nosokomialen, auch die außerhalb von Gesundheitseinrichtungen erworbenen Infektionen (*community-acquired* = CA) mit *S. aureus* steigen stetig an und gewinnen daher an großer Bedeutung [Lowy, 2003]; [Boucher and Corey, 2008].

Als problematisch in der Therapie erweist sich die immer größere Verbreiterung an *S. aureus*-Isolaten mit Resistenzen gegenüber multiplen Antibiotika [Ghebremedhin *et al.*, 2009]. Mitschuld an der erhöhten Infektionsinzidenz und der Resistenzlage trägt unter anderem das Vorgehen in der Patientenversorgung und die Fähigkeit von *S. aureus*, sich immer wieder den veränderten und somit neuen Umweltbedingungen anzupassen [Boucher and Corey, 2008]. So stieg z. B. in den USA der Anteil von Methicillin-resistenten *S. aureus* unter allen detektierten *S. aureus*-Isolaten der Intensivstationen von 35,9 % im Jahr 1992 auf 64,4 % im Jahr 2003 an [Klevens *et al.*, 2006].

Während in vielen Ländern Europas oder der USA bereits ausführliche Untersuchungen und Studien zu *S. aureus* durchgeführt wurden, gibt es im Gegensatz dazu bisher noch keine Arbeiten, die die Populationsgenetik sowie die molekularbiologischen Eigenschaften von *S. aureus* in Panama beschreiben.

Doch bevor dieser Punkt thematisiert wird, bleibt vorab die Frage zu klären, um was für einen Keim genau sich *S. aureus* handelt und was ihn so besonders und überlebensstark macht. Der folgende Abschnitt wird sich dieser Thematik widmen und die Eigenschaften von *S. aureus* näher beschreiben.

1.1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Während Staphylokokken früher neben der Gattung *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus* als Familie der *Micrococcaceae* zusammengefasst wurden, gehören sie seit 2010 nach neuer Nomenklatur der Familie der *Staphylococcaceae* an [Schleifer and Bell, 2010]. Aktuell existieren 72 *Staphylococcus*-Spezies und -Subspezies [DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH]. Sie sind alle gram-positive, unbewegliche, nicht sporenbildende Kokkenbakterien, die sich in dichten Haufen oder

Trauben anordnen (siehe Abbildung 1, rechter Bildteil) [Hof and Dörries, 2009]. Sie exprimieren Katalase-Aktivität und lassen sich in koagulasepositive (*S. aureus*) und koagulasenegative Spezies (unter anderem *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* und *S. haemolyticus*) einteilen.

S. aureus, als wichtigster Vertreter seiner Gattung, ist sowohl ein natürlicher Kommensale als auch ein pathogener Keim des Menschen. Bei ca. 20 % der immunkompetenten Bevölkerung besiedelt er permanent seine ökologische Nische – die Nasenvorhöfe; 30 % werden nur vorübergehend kolonisiert [Gordon and Lowy, 2008]. Der linke Bildteil der Abbildung 1 zeigt typische runde, leicht Elfenbein-gefärbte *S. aureus*-Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 1 mm auf einem Columbia-Blut-Agar.



Abbildung 1: Columbia-Blut-Agar mit *S. aureus*-Kolonien (linker Bildteil)
lichtmikroskopische Aufnahme der haufenförmig angeordneten *S. aureus*-Kokken
nach Gram-Färbung (rechter Bildteil) [Hirschhausen, 2010]

1.2 *S. aureus*-vermittelte Erkrankungen

Die von *S. aureus* ausgelösten Infektionskrankheiten werden in zwei Kategorien eingeteilt. Zum einen sind dies diejenigen, die durch das invasive Auftreten des Erregers begründet sind, zum anderen solche, die Toxin-bedingt sind [Hof and Dörries, 2009]. Generell kann *S. aureus* seine pathogene Potenz meist nur unter bestimmten Voraussetzungen voll entfalten. Dazu zählen z. B. die Abwehrschwäche bzw. Prädisposition des Wirts.

Bei den invasiven *S. aureus*-Erkrankungen werden lokale Infektionen der Haut und Schleimhäute wie Furunkel, Karbunkel, Impetigo follicularis und Mastitis puerperalis von Infektionen innerer Organe (diese entstehen meist durch abszedierende Prozesse) wie Osteomyelitis, Otitis, Endokarditis, Pneumonie und Sepsis unterschieden [Hof and Dörries,

2009]. Die verschiedenen Toxin-bedingten Erkrankungen finden ihren Ursprung/Auslöser in den von *S. aureus* produzierten Toxinen (Exfoliativtoxine, *Toxic Shock Syndrome Toxin* TSST-1, Enterotoxine). So können einerseits das *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome* (SSSS) und das *Toxic Shock Syndrome* (TSS) beschrieben werden, bei denen die Toxine von Staphylokokken sezerniert werden, mit denen sich der Patient infiziert hat. Andererseits existieren die Enteropathien (häufig als Folge von Lebensmittelvergiftungen), bei denen die bereits in der mit *S. aureus* verseuchten Nahrung produzierten Enterotoxine direkt aufgenommen werden [Hof and Dörries, 2009].

1.3 Die wichtigsten von *S. aureus* produzierten Virulenzfaktoren

1.3.1 Zellwandständige und sezernierte Virulenzfaktoren

Wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, gehört *S. aureus* zu den koagulasepositiven Staphylokokken – er produziert also den Pathogenitätsfaktor Koagulase. Dabei handelt es sich um ein Enzym, welches im Serum an Prothrombin bindet und dadurch die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen aktiviert [Hof and Dörries, 2009]. Fibrin umgibt den Keim und wirkt somit als eine Art Schutzpanzer. Diese Schutzhülle wird zusätzlich auch vom A-Faktor (dieser sorgt ebenfalls für eine Fibrinbildung), dem Fibronektin-Bindeprotein (bindet Fibronektin aus extrazellulärer Matrix) und dem Kollagen-/Elastin-Bindeprotein (führt zur Kollagenbindung) gebildet. Ein Faktor, der die antiphagozytäre Eigenschaft von *S. aureus* induziert, ist das Protein A. Es bindet das F_c-Ende von angreifenden Immunglobulinen, wodurch diese nicht mehr für die eigentliche Bindung durch Makrophagen zur Phagozytose des Bakteriums befähigt sind [Lowy, 1998].

Diese genannten Virulenzfaktoren sind alle zellwandständig und in Abbildung 2 dargestellt. Ebenfalls abgebildet im rechten Bildteil sind einige der sezernierten Toxine, wie das Enterotoxin (Kapitel 1.3.3) und das TSST-1 (Kapitel 1.3.4). Diese beiden wirken und agieren als Superantigene [Dinges *et al.*, 2000]; [McCormick *et al.*, 2001]. Superantigen-Toxine haben die Besonderheit, direkte Bindungen mit Immunzellen einzugehen – und das, ohne zuvor von diesen internalisiert zu werden. Sie vernetzen die Klasse II-MHC-Moleküle und die spezifische V_β-Region von T-Zellen [Fleischer and Schrezenmeier, 1988]. Während die konventionelle Antigen-Präsentation nur ungefähr 0,1 % des T-Zell-Bestandes aktiviert, können durch Superantigene zwischen fünf und 30 % der Immunzellen eines Individuums stimuliert werden. Diese Überstimulation führt dementsprechend zu einer überschießenden Ausschüttung von Zytokinen mit einer heftigen Immunreaktion [Dinges *et al.*, 2000]. Das Alpha-Toxin (Abbildung 2) induziert eine Perforation der Membran der Zielzelle [Lowy, 1998].

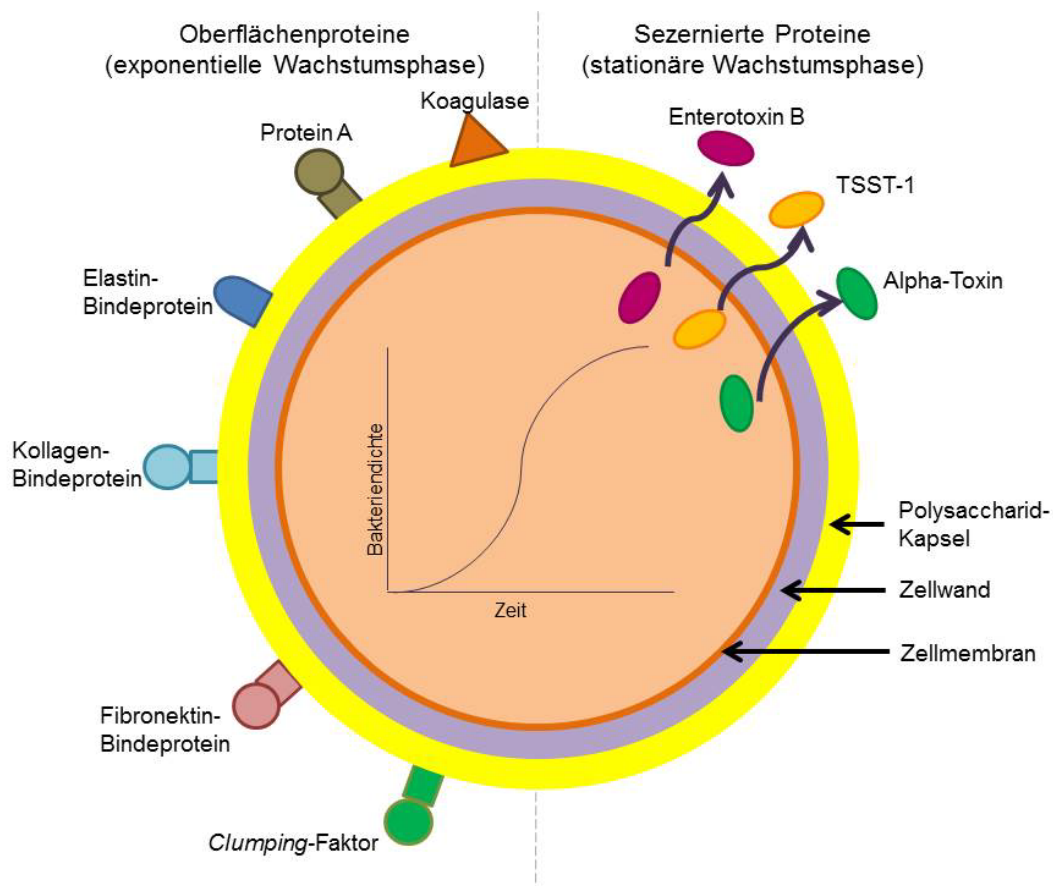


Abbildung 2: Struktur von *S. aureus* mit Zellwandaufbau. Die Abbildung zeigt die einzelnen Oberflächen- (Koagulase, Protein A, Elastin-Bindeprotein, Kollagen-Bindeprotein, Fibronectin-Bindeprotein und Clumping-Faktor) und sezernierten Proteine (Enterotoxin B, TSST-1 und Alpha-Toxin). Die Synthese ist abhängig von der Wachstumsphase und wird kontrolliert von Regulatorgenen wie z. B. *agr* [in Anlehnung an [Lowy, 1998].

1.3.2 Hämolyse und Leukozidine

Zusätzlich produziert *S. aureus* mehrere Hämolyse (Hämolsin α , β , γ und δ) und Leukozidine. Hämolyse führen zur Hämolyse – der Auflösung von Erythrozyten durch Zerstörung der Zellmembran. Das Vorgehen der einzelnen Hämolyse unterscheidet sich jeweils voneinander. So bindet Hämolsin α an die Oberfläche der Zielzelle und lässt einen Aquaporin-Kanal entstehen, wodurch es zum Zelltod und zur Lyse kommt [Gouaux *et al.*, 1997]. Hämolsin β führt nicht durch den Einbau von Poren, sondern durch Hydrolyse des Zellwandbestandteils Sphingomyelin zur Lyse [Vandenesch *et al.*, 2012]. Das Hämolsin γ wirkt zelltoxisch auf polymorphkernige Zellen, Monozyten und Makrophagen [Gouaux *et al.*, 1997]. Hämolsin δ indes wirkt unterschiedlich: In allen Fällen bindet es an die Zielzelloberfläche und führt dort 1. zur Bildung transmembranärer Poren, 2. greift es die

Oberflächenkrümmung der Membran an und destabilisiert diese und 3. fungiert es in hoher Konzentration als „Reinigungsmittel“ und löst so die Membran auf [Vandenesch *et al.*, 2012].

Zu den Leukozidinen gehört das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL). Dabei handelt es sich um ein Zwei-Komponenten-Zytotoxin [Diep *et al.*, 2004]. *S. aureus*, die das Gen für PVL tragen, sind unter anderem verantwortlich für Haut- und Weichgewebsinfektionen (*skin and soft tissue infections*, SSTIs) wie Abszesse oder Furunkel. Häufig fällt auf, dass diese rezidivierend auftreten und keine erkennbare Eintrittspforte besitzen; Verläufe über Jahre kommen vor [Linde and Lehn, 2005]. Aber auch schwere Infektionen wie nekrotisierende Pneumonien sind diesen zuzuschreiben [Diep *et al.*, 2004]; [Rasigade *et al.*, 2010]. Diese können allerdings auch durch CA-MRSA (MRSA = Methicillin-resistente *S. aureus*) ausgelöst werden. Rasigade *et al.* führten im Jahr 2010 eine Studie durch, in der sie herausfanden, dass die meisten PVL-positiven Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Isolate pandemisch und gleichzeitig mit CA-MRSA phylogenetisch verwandt sind.

Die toxische Wirkung des PVL liegt in einer hoch affinen Bindung an Granulozyten und Makrophagen begründet, bei denen eine Porenbildung zur massiven Ausschüttung des Zellinhalts mit nachfolgendem Zelltod führt. Epidemiologisch brisant ist die Tatsache, dass sich PVL durch Phagen auf andere *S. aureus*-Isolate übertragen lässt [Linde and Lehn, 2005]. So beträgt der Anteil PVL-positiver *S. aureus*-Isolate aus klinischem Probenmaterial zwei bis sechs Prozent [Prevost *et al.*, 1995].

1.3.3 Staphylokokken-Enterotoxine (SE)

Staphylokokken-Enterotoxine fungieren als Superantigene und sind Auslöser von Lebensmittelintoxikationen, da sie im Verdauungstrakt ihre Wirkung entfalten [Dinges *et al.*, 2000]. Mittlerweile sind viele Serotypen des Toxins mit SEA bis SEE (die klassischen SE-Typen), SEG bis SER und SEU beschrieben worden [Thomas *et al.*, 2006]; [Becker *et al.*, 2007]. Der Keim selbst muss dabei nicht im Gastrointestinaltrakt anwesend sein. Unter geeigneten Bedingungen wurden die Enterotoxine bereits von *S. aureus* in die verseuchte Nahrung sezerniert und somit direkt aufgenommen [Hof and Dörries, 2009]. Die Enterotoxine werden in der postexpositionellen Wachstumsphase produziert. Allerdings werden sie nur in einer Vorstufe gebildet, ausgestattet mit einer Signalsequenz, die während des Transports aus der Zelle abgespalten wird [Dinges *et al.*, 2000]. Die Toxine weisen sich aus durch eine hohe Widerstandsfähigkeit insbesondere im Hinblick auf hohe Temperaturen [Becker *et al.*, 2007]. Ähnlich sieht es nach oraler Aufnahme im Verdauungstrakt aus, da Enterotoxine stabil gegenüber proteolytischen Enzymen wie Trypsin und Papain sind.

Bergdoll hat 1989 die klinische Symptomatik zusammengefasst: Die Enteropathie ist charakterisiert durch eine kurze Inkubationszeit von ein bis maximal sechs Stunden und einer Krankheitsdauer von nur einem bis zwei Tagen. Die Symptome äußern sich in Erbrechen mit oder ohne Durchfall, unter anderem vergesellschaftet mit Unwohlsein, Schweißausbrüchen, Schwindelgefühl, Kopf-, Leibschmerzen, Muskelkrämpfen und einer normal bis subnormalen Körpertemperatur [Bergdoll, 1989].

1.3.4 Toxic-Shock-Syndrome-Toxin (TSST-1)

Das Superantigen TSST-1 ist Auslöser des toxischen Schock-Syndroms (TSS). Erstmals beschrieben wurde das TSS von Todd *et al.* [Todd *et al.*, 1978]. Ein größeres Interesse erlangte es in den 80er Jahren, als ein Zusammenhang der Krankheitsauslösung mit der Verwendung von Tampons bei sonst gesunden Frauen entdeckt wurde [Shands *et al.*, 1980]. Mittlerweile allerdings wird TSS häufiger in Verbindung mit lokalen *S. aureus*-Infektionen gesehen [Fitzgerald *et al.*, 2001].

Das toxische Schock-Syndrom ist eine akute Erkrankung, die sich über Fieber, Hautausschlag, niedrigen Blutdruck und Desquamation definiert, welche in multiplen Organversagen und tödlichem Schock enden kann [McCormick *et al.*, 2001]. Weitere Symptome können sein: Muskelschmerzen, Erbrechen und Diarrhöe, Nieren- und Leberschäden und Bewusstseinstörungen.

Etwa 20 % der natürlich vorkommenden *S. aureus*-Isolate produzieren das Toxin TSST-1 [Lindsay *et al.*, 1998]. Das kodierende Gen *tst* kommt auf den Pathogenitätsinseln vor, die eine große Interaktion mit Staphylokokkenphagen aufweisen [Lindsay *et al.*, 1998].

1.4 Das Regulatorgen *agr*

Die Produktion der vielen unterschiedlichen Virulenzfaktoren unterliegt einer koordinierten Regulation durch sogenannte Regulatorsysteme. Eines dieser Systeme ist der Regulatorlocus *agr*, der *accessory gene regulator*, der im Rahmen der *S. aureus*-Untersuchungen dieser Arbeit typisiert wurde. Insgesamt existieren vier *agr*-Gruppen der Typen I bis IV, die sich aufgrund einer hypervariablen Region im *agr*-Locus unterscheiden [Jarraud *et al.*, 2000]; [Lina *et al.*, 2003]. Abbildung 3 stellt die Organisation des *agr*-Systems dar. In der hypervariablen Region befinden sich Teile der drei Gene *agrB*, *agrC* und *agrD*. Des Weiteren existiert auf dem Locus noch ein *agrA*-Gen, welches allerdings nicht der hypervariablen Region angehört [Novick *et al.*, 1993].

Die kodierten Proteine der Gene *agrA* und *agrC* zählen zu einem klassischen Zwei-Komponenten-Signaltransduktionsweg, der die Aktivierung des *Quorum sensing* nach sich zieht [Novick, 2003]. Diese Fähigkeit des *agr*-Locus bedeutet Folgendes: Sobald eine gewisse *S. aureus*-Bakteriendichte erreicht ist, kommt es zu einer Selbstaktivierung des Systems über das AIP, das autoinduzierende Peptid [Ji *et al.*, 1995]; [Jarraud *et al.*, 2000]. *AgrD* kodiert für das Vorläufer-Protein des AIP (Abbildung 3a), gleichzeitig inhibiert es die *agr*-Expression anderer Bakterienstämme. Das von *agrB* kodierte Protein AgrB wandelt das Vorläufer-AIP zum funktionstüchtigen um, welches dann am von *agrC* produzierten Rezeptor bindet (Abbildung 3b) [Jarraud *et al.*, 2000]. Dadurch wird das AgrA-Protein phosphoryliert (Abbildung 3c) und aktiviert gemeinsam mit dem Protein SarA die Promotoren P2 und P3. Eine erhöhte RNA III-Transkription wird ausgelöst (Abbildung 3d), welche wiederum die Expression der sezernierten Proteine (wie z. B. Hämolyse und Toxine) erhöht und zugleich die der Oberflächenproteine vermindert [Novick *et al.*, 1993].

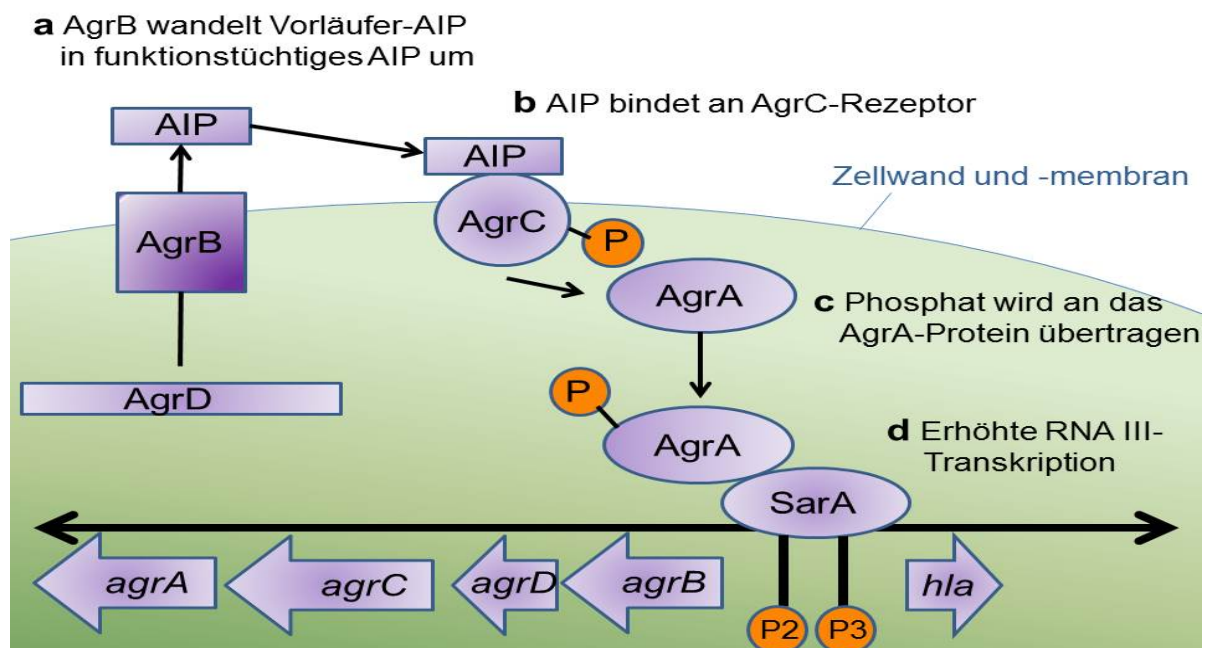


Abbildung 3: Aufbau des *agr*-Regulator-Systems [in Anlehnung an Fuqua and Greenberg, 2002]. Es stellt dessen Organisation in den Schritten **a**, **b**, **c** und **d** dar.

(**a**: Produktion des Vorläuferproteins AIP; **b**: funktionstüchtiges AIP bindet an AgrC-Rezeptor; **c**: Phosphorylierung von AgrA und **d**: Auslösung einer erhöhten RNA III-Transkription, welche die Expression der Oberflächen- und sezernierten Proteine beeinflusst.)

1.5 Antibiotika-Resistenz von *S. aureus*

Bereits kurz nach der Einführung von Penicillin als Antibiotikum in den 1940er Jahren wurden erste Berichte zu Penicillin-resistenten *S. aureus*-Isolaten veröffentlicht [Parker and Lapage, 1957]. Im Laufe der Jahre kamen Resistenzen gegenüber vielen anderen Antibiotika hinzu. Mittlerweile sind geschätzt 80 % der *S. aureus*-Isolate resistent gegenüber Penicillin. Der dafür verantwortliche Resistenzmechanismus ist dem von *S. aureus* produzierten Enzym β -Laktamase – auch Penicillinase genannt – zuzuschreiben [Chambers, 1997]. Dieses hydrolysiert den wirksamen β -Laktam-Ring von Penicillinen und einigen Cephalosporinen. Trotz Entwicklung von β -Laktamase-festem Methicillin (weiterhin noch stabil gegenüber β -Laktamase sind Oxacillin, Flucloxacillin und Dicloxacillin), generierten sich Methicillin-resistente *S. aureus*-Isolate (MRSA), deren Infektionen als sehr kritisch anzusehen sind [Lencastre *et al.*, 2007]. Die ersten MRSA-Isolate traten 1961 in Großbritannien schon wenige Monate nach Einführung des Methicillins auf [Jevons, 1961]. In den 1980er Jahren entwickelten sich epidemische multiresistente MRSA-Isolate, die sich weltweit in Krankenhäusern verbreiteten. Als in den 1990er Jahren durch Präventions- und Kontrollmaßnahmen die HA-MRSA-Rate in vielen europäischen Ländern und den USA auf hohem Niveau stabilisiert wurde und größtenteils reduziert wurde, traten gehäuft CA-MRSA außerhalb von Gesundheitseinrichtungen auf [Gordon and Lowy, 2008].

Bei MRSA-Infektionen wird je nach Lokalisation des Herdes sowie Grunderkrankung und Begleiterkrankungen des Patienten Vancomycin (Glycopeptid), Linezolid oder Daptomycin eingesetzt. Allerdings handelt es sich hierbei teilweise um teure und nebenwirkungsreiche Reserveantibiotika. Erwähnenswert ist das Vorkommen von Vancomycin-resistenten *S. aureus*-Isolaten (VRSA) 2002 in den USA und Japan [Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2002]; [Lencastre *et al.*, 2007].

1.5.1 Das *mecA*-Gen und sein Penicillin-Binde-Protein 2a (PBP 2a)

Zusätzlich zu dem sich auf der Zellwand von *S. aureus* befindlichen Penicillin-Binde-Protein (PBP) exprimieren entsprechende MRSA-Isolate noch das Penicillin-Binde-Protein 2a (PBP 2a), welches vom *mecA*-Gen kodiert wird [Chambers, 1997].

Unter einer Therapie mit einem β -Laktam-Antibiotikum kommt es im Normalfall bei Sensibilität der *S. aureus*-Isolate zu einer Interaktion von β -Laktam-Antibiotikum und PBP, wodurch dieses inaktiviert wird und die Bakterienzellwandsynthese nicht mehr stattfinden kann. Das Besondere des bei MRSA-Isolaten vorhandenen zusätzlichen PBP 2a allerdings besteht in seiner nur sehr niedrigen Affinität zu β -Laktamen. Selbst wenn β -Laktamase-feste

Antibiotika an PBP binden, kann die Zellwandsynthese von *S. aureus* durch PBP 2a weiterhin aufrechterhalten werden [Chambers, 1997].

1.5.2 SCCmec-Typ

Das *mecA*-Gen ist in dem SCCmec-Genelement-Komplex (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) eingebettet [Katayama *et al.*, 2000]. Die *International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements* hat auf ihrer Internetseite mittlerweile elf detektierte SCCmec-Haupttypen und viele Subtypen aufgelistet [IWG-SCC, 2010].

Reguliert wird die Expression des *mecA*-Gens von zwei Regulationselementen *mecl* und *mecR1*, die sich ebenfalls auf dem SCCmec-Komplex befinden [Chambers, 1997]. Dabei wirkt das von *mecl* kodierte Protein als Repressor und blockiert die *mecA*-Transkription, das MecR1-Protein agiert als Signalgeber und initiiert somit die Synthese von PBP 2a [Garcia-Castellanos, 2003]. Die *mecA*-Transkriptions-Induktion oder ihre -Repression durch *mecR1* oder *mecl* werden durch die An- bzw. Abwesenheit von einem β -Laktam-Antibiotikum bestimmt [Sharma *et al.*, 1998]; [McKinney *et al.*, 2001].

Für den Übertragungsweg der SCCmec-Genelemente wird von einem horizontalen Gentransfer aus einer entfernt verwandten Staphylokokkenspezies ausgegangen [Crisostomo, 2001]; [Hiramatsu *et al.*, 2001].

1.6 Vorkommen von MRSA

Wie bereits in 1.1 erwähnt, ist *S. aureus* sowohl ein natürlicher Kommensale als auch ein pathogener Keim des Menschen. Ca. 20 % der immunkompetenten Bevölkerung sind permanent besiedelt [Gordon and Lowy, 2008]. Nach aktuellen Schätzungen sind weltweit bis zu zwei Milliarden Menschen Träger von *S. aureus*. Von diesen beträgt der Anteil an MRSA zwischen zwei bis 53 Millionen – Ausgangslage dieser Kalkulationsspanne sind niedrige MRSA-Infektionsraten in den Niederlanden und höhere in den USA [Grundmann *et al.*, 2010]; [Stefani *et al.*, 2012]. Vergleicht man systemische MRSA-Infektionen mit denjenigen hervorgerufen von MSSA (Methicillin-sensible *S. aureus*), so existieren bei MRSA größere Mortalitätsraten.

Der vorherrschende MRSA-Typ bleibt weiterhin der nosokomiale (HA-MRSA). Weltweit existiert ein unterschiedlich starkes Verteilungsmuster (Abbildung 4).

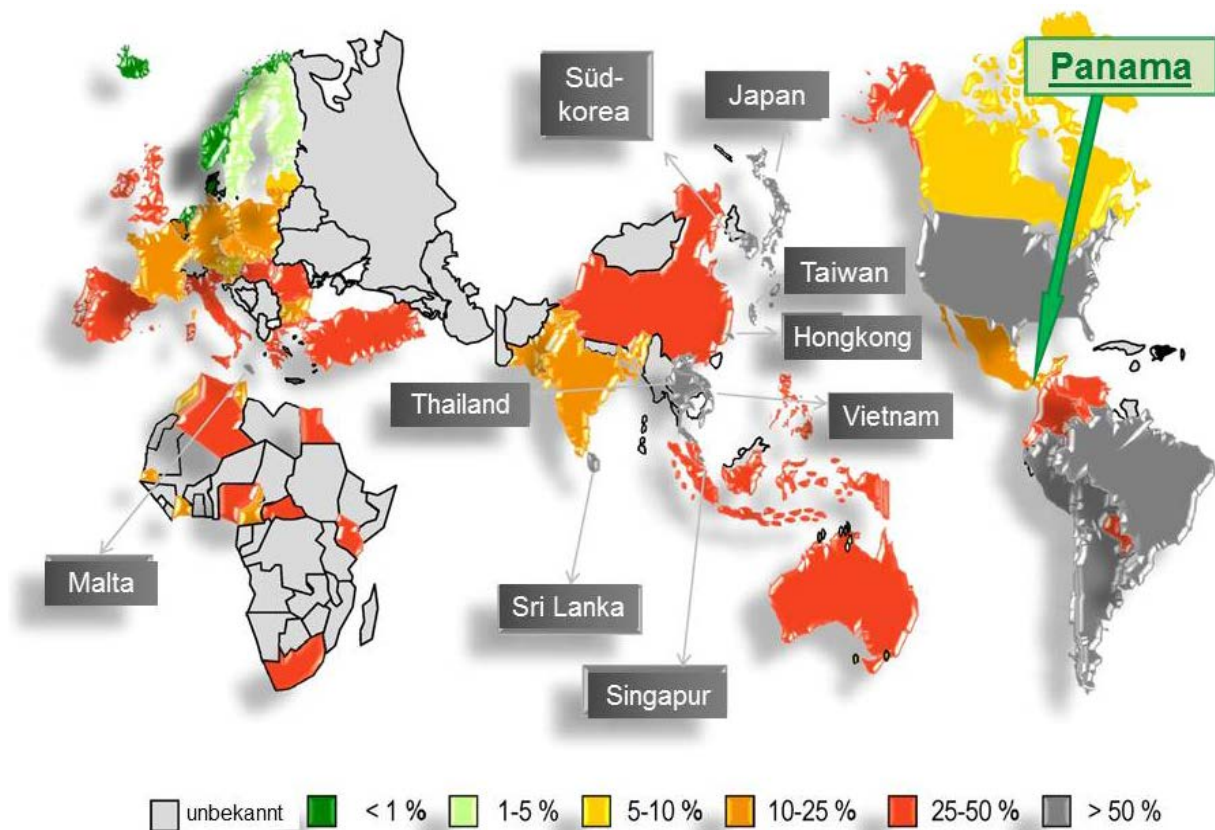


Abbildung 4: Weltweite Verteilung von HA-MRSA (Panama mit grünem Pfeil eingezeichnet) [in Anlehnung an Stefani *et al.*, 2012].

Von der höchsten HA-MRSA-Verteilungsrate mit mehr als 50 % kann unter anderem in Teilen Nord- und Südamerikas, Japan und Malta gesprochen werden [Stefani *et al.*, 2012]. In den USA stieg beispielsweise die MRSA-Infektionsrate von 35,9 % im Jahr 1992 auf dramatische 64,4 % im Jahr 2003 an – Tendenz steigend [Klevens *et al.*, 2006]. Auch in Lateinamerika sind im Durchschnitt 50 % aller *S. aureus*-Infektionen MRSA-Ursprungs [Rossi *et al.*, 2008].

Aus Panama existieren aktuell keine Berichte bezüglich der MRSA-Ausbreitung, allerdings haben Reyes *et al.* 2009 in ihren Untersuchungen die MRSA-Prävalenz unter den im Krankenhaus detektierten *S. aureus*-Isolaten von Panamas Nachbarland Kolumbien (45 %) und wiederum dessen umliegenden Nachbarstaaten Ecuador (28 %), Peru (62 %) und Venezuela (26 %) untersucht [Reyes *et al.*, 2009].

Über eine 25 bis 50 %-MRSA-Rate wird in China, Australien, Afrika und einigen europäischen Ländern wie Portugal (49 %), Griechenland (40 %), Italien (37 %) und Rumänien (34 %) berichtet, während andere Staaten Europas – zu nennen seien insbesondere die Niederlande (0,9 %) und Skandinavien (<1 % bzw. 1 bis 5 %) – nur eine

geringe Prävalenz aufweisen [Grundmann *et al.*, 2010]; [Mejía *et al.*, 2010]; [Song *et al.*, 2011]; [Stefani *et al.*, 2012]; [van Cleef *et al.*, 2012].

Doch auch MRSA, die außerhalb des Krankenhauses erworben werden, den sogenannten *community-acquired* MRSA (CA-MRSA), müssen ein hohes Maß an Bedeutung zugerechnet werden. Bereits in den 1990er Jahren wurden über erste Infektionen mit CA-MRSA berichtet – bei gesunden Personen ohne vorhergehenden Kontakt zur Gesundheitspflege bzw. Krankeneinrichtungen und dazu auch ohne jederlei prädisponierende Risikofaktoren [Herold *et al.*, 1998]; [Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1999]. Seither existieren weltweit Ausbrüche von CA-MRSA-Infektionen, wobei die verantwortlichen Isolate auf fünf klonale Linien zurückgeführt werden können: ST1 (*Midwest Clone*), ST30 (*South West Pacific Clone*), ST80 (*European Clone*), ST59 (*Pacific Clone*) und ST8 (auch bekannt als „USA300“) [Diep and Otto, 2008].

Der Unterschied von CA- zu den HA-MRSA-Isolaten besteht des Öfteren in ihrer Zugehörigkeit zur *agr*-Gruppe III, dem *SCCmec*-Typ IV, der mehrheitlichen Produktion von PVL und einer Sensibilität gegenüber vielen Antibiotika (ausgenommen den β -Laktamen) [Ma *et al.*, 2002]; [Diep and Otto, 2008].

1.7 Feintypisierungsverfahren von *S. aureus*-Isolaten

1.7.1 Multilocus-Sequenzanalyse

Zur Genotypisierung werden in dieser Arbeit unter anderem das Verfahren der Multilocus-Sequenzanalyse (*Multilocus Sequence Typing* = MLST) und der *spa*-Typisierung (siehe Kapitel 1.7.2) verwendet.

Bei der MLST werden zur Charakterisierung der Bakterienstämme die Nukleotidsequenzen von sieben hochkonservierten Regionen, den sogenannten *housekeeping genes*, ermittelt [Enright and Spratt, 1999]; [Enright *et al.*, 2002]. Zu den *housekeeping genes* zählen Carboxyltransferase (*arcC*), Shikimatdehydrogenase (*aroE*), Glycerinkinase (*glpF*), Guanylatkinase (*gmk*), Phosphatacetyltransferase (*pta*), Triosephosphatisomerase (*tpi*) und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (*yqiL*). Die ermittelten individuellen Sequenzen an jedem Locus eines Genfragments werden als Allele bezeichnet. Diesen unterschiedlichen Allelen werden wiederum verschiedene Nummern zugeteilt [Enright and Spratt, 1999]. Jeder Bakterienstamm beschreibt sich über seine gesonderte Allel-Zusammensetzung an den sieben Loci in seinem eigenen allelischen Profil, welchem zudem ein Sequenztyp (ST) zugewiesen wird. Besitzen nun zwei Isolate die gleiche ST-Gruppe, so gehören sie einem

Klon an, geringe Abweichungen im allelischen Profil im Sinne eines *single locus variants* (SLV) oder *double locus variants* (DLV) weisen auf eine Verwandtschaft hin [Enright *et al.*, 2002]. Über eine Internet-basierte Datenbank (www.mlst.net) lassen sich den *S. aureus*-Isolaten die entsprechenden Sequenztypen zuweisen.

1.7.2 *spa*-Typisierung

Um eine Feintypisierung bzw. klonale Zuordnung von MRSA-Isolaten vorzunehmen, besteht die Möglichkeit, eine kostengünstigere und weniger zeitaufwendige Typisierungsmethode, die *spa*-Sequenzierung, einzusetzen [Harmsen *et al.*, 2003]. Die Zeitersparnis hat unter anderem mit der Sequenzierung von nur einem Genlocus zu tun – im Vergleich: bei der MLST handelt es sich um sieben Loci. Es wurde daher ein Bezug zwischen MLST und *spa*-Typisierung beschrieben. Analysiert wird hierbei die Nukleotidsequenz des hochvariablen Bereichs innerhalb des *S. aureus*-Protein A-Gens (*spa*). Protein A ist Zellwandbestandteil von *S. aureus*, sein Gen setzt sich aus einer Fc-Region, einer hochvariablen X-Region und einem C-Terminus zusammen [Uhlén *et al.*, 1984]. Für die *spa*-Sequenzierung von Wert ist allerdings nur die Repeat-Region X. Je nach Abfolge und Art der Repeats ergibt sich somit der jeweilige *Spa*-Typ. Über die StaphRIDOM-Software (StaphType) lässt sich die *spa*-Typisierung den einzelnen Bakterienstämmen zuweisen [Harmsen *et al.*, 2003]. Mit Hilfe der *spa*-Sequenzierung lassen sich die *S. aureus*-Isolate noch stärker differenzieren als bei der MLST. So können innerhalb eines STs mehrere verschiedene *spa*-Typen detektiert werden.

1.8 Aufgabenstellung

In Panama war die klonale Verteilung von *S. aureus*-Isolaten bisher noch nicht Gegenstand von Forschungsarbeiten gewesen. Daher war ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit die Analyse von phäno- und genotypischen Eigenschaften von *S. aureus*-Isolaten Panamas. Die Expression der Superantigene von *S. aureus*-Isolaten aus Panama und die Erkenntnis darüber, welche Kombination unterschiedlicher Superantigene eines bestimmten Klons die Schwere und das pathogene Potential des Erregers bestimmt, war von großer Bedeutung.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war:

- Resistenzverhalten der *S. aureus*-Isolate mit Bestimmung des Resistenzphänotyps
- Bestimmung der *agr*-Gruppe, der Toxingene und des SCC*mec*-Typs
- Zusammenhang zwischen den *agr*-Gruppen und dem Toxingenprofil
- Zusammenhang zwischen den Resistenzprofilen und SCC*mec*-Typen
- Untersuchungen zur klonalen Dissemination von *S. aureus* mittels MLST (*Multilocus Sequence Typing*) und *spa*-Typisierung
- Generierung eines phylogenetischen Stammbaums zur Analyse der Verwandtschaftsgrade der ermittelten klonalen Linien in Panama

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Brutschrank für Bakterien	Typ B 5050 E. (Heraeus, Hanau)
Elektrophoresekammern	peqlab Biotechnologie GmbH
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)
Mischgerät („Vortexer“)	Reax top (Heidolph)
NanoDrop ND 1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
pH-Meter	CG 820 (Schott, Göttingen)
Sequenzierer	3100 Genetic Analyzer (Hitachi, Applied Biosystems, Foster City, USA)
Spannungsgerät	PHERO-stab. 500, <i>Electrophoresis Powersupply</i> (Biotec Fischer)
Sterilwerkbank	HeraSAFE (Heraeus)
Thermocycler	Gradient Cyler; PTC-225 Peltier Thermal Cyler (MJ-Research)
UV-Transilluminator	Kodak, <i>Gel Logic 100 Imaging System</i> , Programm Kodak 1D v.3.6.1., Stuttgart, Deutschland
Zentrifugen	Sigma Laboratory Centrifuges 4K15C (Qiagen) Multifuge 1 s-r (Heraeus) Ultrazentrifuge TL-100 mit Rotor TLA 100.3/1468 (Beckmann, München)

2.2 Plastikmaterialien und Zubehör

Eppendorf, Hamburg	Pipetten: 0,5-10 µl; 10-100 µl; 50-200 µl; 100-1000 µl 1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße
Greiner Bio-One	Kristall- (0,5-20 µl) und Pipettenspitzen (10-100 µl; 100-1000 µl)
Nunc, Langensfeld	Mikrotiter-Platten (96 wells)

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

2.3.1 Enzyme und Reagenzien

Lysostaphin, Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K; dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase Kit	Qiagen, Hilden

2.3.2 Chemikalien und Lösungen

Agarose LE	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ethidiumbromid 1%	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ (25 mM)	
Nuclease-Free Water	Qiagen, Hilden

2.3.3 Käuflich erworbene Kits

Big Dye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
HiDi Formamide	
PCR Purification Kit; Dye Ex 2.0 Spin Kit; QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.3.4 Puffer und Lösungen

10x PCR Buffer	Qiagen, Hilden
TRIS borate EDTA buffer substance	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
10x EDTA Buffer	Applied Biosystems, Foster City, USA
3100 POP6 Polymer	Applied Biosystems, Foster City, USA

Sämtliche in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Größenmarker wurden von der Firma Fermentas bezogen.

2.4 Bakterien und Kulturmedien

2.4.1 *S. aureus*-Isolate aus Panama

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 131 Abstriche aus Panama untersucht, die in den Jahren 2008 bis 2010 gesammelt und bei -80°C aufbewahrt wurden. Jene wurden aus unterschiedlichen Materialien von Patienten des Universitätsklinikums Hospital Santo Tomás in Panama City, Panama gewonnen.

Unter den Proben befanden sich 119 *Staphylococcus aureus*-Isolate. Darunter wurden 18 Methicillin-sensible (MSSA) und 101 Methicillin-resistente (MRSA) *S. aureus*-Isolate identifiziert.

Die restlichen zwölf Abstriche verteilten sich wie folgt: In zwei Abstrichen waren keine Bakterien nachweisbar, bei einer weiteren handelte es sich um einen gram-negativen Keim und drei *Kocuria kristinae*-Isolate wurden nachgewiesen. Weitere Staphylokokkenspezies waren zwei *S. epidermidis*-Isolate und jeweils ein Isolat *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lentus* und *S. sciuri* wurden detektiert.

2.4.2 Kulturmedien

Die Bakterien-Kultivierung erfolgte auf Columbia-Blut-Agar, einem Festmedium bestehend aus Pepton (5,0 g/l), Fleischextrakt (1,0 g/l), Hefeextrakt (1,0 g/l), Natriumchlorid (5,0 g/l), Agar (15,0 g/l); autoklaviert.

2.5 Phänotypische Methoden

2.5.1 Kultivieren von *S. aureus*

Mit einem Tupfer und anschließendem Dreiösenausstrich wurden die Bakterien auf Columbia-Blut-Agar übertragen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C bebrütet. Hierbei entstanden Einzelkolonien, meist Reinkolonien, die weiterverarbeitet wurden. Bei Reinkolonien handelt es sich um Nachkommen nur einer Bakterienzelle.

Um den Bakterienstamm zu erhalten, wurden zusätzlich Cryokulturen angelegt (Cryobank, Mast Diagnostica, UK). Mit Hilfe einer Öse wurden einige Kolonien eines Probenisolates in ein Cryo-Röhrchen übertragen, in dessen Lösung sich viele kleine mit Löchern versehene Kügelchen befanden. Beim Vortexen lagerten sich die Bakterien in diese Löcher ein. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurden die Cryos bei -80°C gelagert. Die Möglichkeit zur

Rekultivierung bestand, indem eines der Kügelchen auf Columbia-Blut-Agar verstrichen und erneut bebrütet wurde.

2.5.2 Identifizierung der *S. aureus*-Phänotypen

Mit dem automatisierten VITEK[®]2-System (von bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) war es möglich, in relativ kurzer Zeit Antibiotogramme zu erstellen und Bakterien zu identifizieren. Die Identifizierung der Bakterienisolate basierte auf verschiedenen biochemischen Reaktionen (Enzymnachweis-, Oxidations-, Fermentations-, Kohlenhydratabbau- und Wachstumstests ebenso wie das Feststellen von pH-Wert-Veränderungen).

Eine Großzahl bakterieller Referenzstämme mit ihren jeweiligen spezifischen typischen Reaktionen auf verschiedene biochemische Substrate ist in speziellen Datenbanken festgehalten. Die Kombination der einzelnen Reaktionsergebnisse – in Biotypnummern umgeschrieben – wurde mit dem im Speicher befindlichen Datensatz verglichen und einem Speziesnamen zugeordnet [Layer *et al.*, 2006].

Nach Anzucht der Bakterienreinkolonien auf Columbia-Blut-Agar wurde mit Hilfe des VITEK[®]2 sowohl deren Identifikation zur Bakterienart anhand einer gram-positiven Identifizierungskarte *ID-GPC* als auch ihre Sensibilität bzw. Resistenz gegen verschiedene Antibiotika mit einer Resistenzkarte *AST-P580* getestet (Abbildung 5).

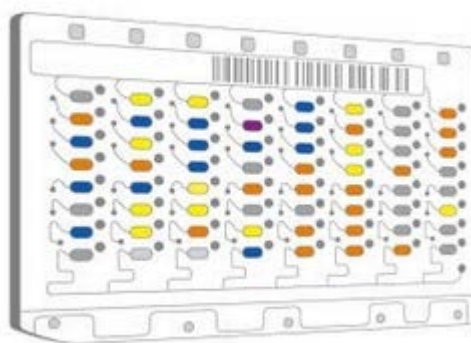


Abbildung 5: Schema einer VITEK[®]2-Identifizierungskarte [bioMérieux]

Diese Reinkolonien impfte man in ein Reagenzglas mit 2,5 ml 0,45%iger Kochsalzlösung ein. Die Dichte der Bakteriensuspension sollte bei Kokken einen Standard von 0,5 McFarland betragen. Im VITEK[®]2 wurde die Bakteriensuspension anschließend gleichmäßig in die Küvetten der Karte aufgesaugt. Die Ablesung der Messergebnisse erfolgte daraufhin photometrisch. Gemessen wurde die Dichteveränderung in der Küvette. Trübte sich der Inhalt einer Küvette der Antibiotikaresistenzkarte, war dies Zeichen für ein Bakterienwachstum trotz Anwesenheit von Antibiotikum in dieser Kammer und entsprach

somit einer Resistenz des Bakterienstammes gegen dieses. Kam es zu keiner Trübung bzw. Veränderung, konnte also kein Wachstum nachgewiesen werden. Hier bestand eine Sensibilität des Bakterienstammes gegen das Antibiotikum. Die Aufarbeitung der Proben und die Auswertung erfolgte nach den Richtlinien des Herstellers (Software Version 4.01).

2.6 Genotypische Methoden

2.6.1 DNA-Isolation

Für die Präparation der chromosomalen DNA aus *S. aureus* wurde das QIAmp DNA-Mini Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Mit einer sterilen Impföse wurde die im vorigen Versuch hergestellte Bakteriensuspension mit einem McFarland-Standard von 0,5 auf einen Columbia-Blut-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Bei den gewachsenen Kolonien handelte es sich nur noch um Reinkolonien, die für die DNA-Isolation benötigt wurden. Um die DNA aus den verschiedenen Bakterienisolaten zu präparieren, wurden zunächst 160 µl Puffer ATL + 20 µl Lysozym in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert. Nach Zugabe von zwei bis drei Impfösen der Bakterienkultur und Resuspension mit Hilfe des Vortexers fand die Inkubation der Proben für 30 min bei 37°C im Eppendorf Thermomixer comfort für 1,5 ml-Eppendorfgefäße statt.

Der ATL-Puffer und der im Weiteren genannte AL-Puffer sind Lyse-Lösungen. Sie induzieren die Lyse des Zellgewebes, der Zellmembran und der Kernhülle; Lysozym, auch Muramidase genannt, ist ein Enzym, welches in Bakterien, in Bakteriophagen, Pflanzen und Tieren vorkommt. Es löst als bakteriolytisches Enzym die Proteoglykankomponente der Bakterienmembran auf, indem es die β 1→4-Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure hydrolysiert. So erst ist überhaupt die Chance gegeben, DNA zu extrahieren.

In einem nächsten Schritt wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL hinzugefügt, per Vortexer gemixt und für erneute 30 min, nun aber bei 70°C, im Thermomixer belassen. Proteinase K ist sowohl eine Endo- als auch eine Exopeptidase und zerlegt die nach Zellmembranzerstörung frei gewordenen Proteine in kleinere Peptide und Aminosäuren.

Nach abgelaufener Zeit verblieben die Eppendorfgefäße zusätzliche 15 min bei 95°C im Thermomixer. Anschließend wurden 200 µl 100%iges Ethanol zur Fällung hinzugefügt, der Ansatz erneut gemischt und der vollständige Überstand auf eine QIAamp-Zentrifugationssäule (QIAamp Mini Spin Column) – in einem 2 ml-Eppendorfgefäß stehend –

übertragen. Durch Zentrifugation für 1 min bei 8000 u/min wurde die DNA mittels ionischer Verbindungen in der Säulenmembran gebunden. Zur Herauswaschung von Fremdmaterial, wie zum Beispiel Zelltrümmer, welche sich neben der DNA ebenfalls in der Säulenmembran befinden und diese somit verunreinigen, wurde die Säule in ein sauberes 2 ml-Eppendorfgefäß gesetzt, 500 µl des Puffers AW1 zugefügt und das Ganze für 1 min bei 8000 u/min zentrifugiert. Anschließend erneutes Umfüllen des Säuleninhalts in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß, Hinzufügen von 500 µl Puffer AW2 und nochmaliges Zentrifugieren bei 14000 u/min für 10 min.

In einem letzten Schritt wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß übertragen und mit 100 µl AE-Puffer befüllt. Nach einer Wartezeit von 1 min bei Raumtemperatur Zentrifugation der Säule für 1 min bei 8000 u/min und Verwerfen der Säule. Die isolierte gereinigte DNA befand sich nun im 1,5 ml-Eppendorfgefäß und konnte weiterverwendet oder zur Aufbewahrung eingefroren und gelagert werden.

2.6.2 Messung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäure fand im NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) bei einer Absorption von 260 nm Wellenlänge statt. Eine gemessene optische Dichte ($OD_{260\text{ nm}}$) von 1 entspricht dabei etwa 50 µg/ml einer doppelsträngigen DNA-Konzentration bzw. 40 µg/ml einer einzelsträngigen RNA. Nukleinsäuren (also DNA und RNA) absorbieren bei einer Wellenlänge von 260 nm UV-Licht, während Proteine zumeist bei einem Absorptionsmaximum von 280 nm angeregt werden. Daher ist der Quotient $\text{Absorption}_{260\text{nm}}/\text{Absorption}_{280\text{nm}}$ als ein Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäure anzusehen. Werte zwischen 1,8 und 2,0 sprechen also für eine reine Lösung an Nukleinsäuren.

2.6.3 PCR – Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasekettenreaktion (englisch *polymerase chain reaction, PCR*) handelt es sich um eine Standardmethode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten [Saiki *et al.*, 1988]. Die doppelsträngige DNA mit dem zu vervielfältigenden Abschnitt dient hierbei als *template* bzw. Matrize.

Während der PCR kommt es zur zyklischen Wiederholung von folgenden Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA in zwei einzelsträngige

2. Zwei Oligonukleotid-Primer (*annealing*), die zu den DNA-Einzelsträngen komplementär sind, lagern sich am 3'-Ende des zu kopierenden DNA-Bereichs an und bilden den Startpunkt für die DNA-Polymerase.
3. Synthese des komplementären Stranges (Polymerisierung) mit Hilfe der DNA Polymerase und den vier Desoxynukleotiden. Es kommt zu einer exponentiellen Vermehrung des DNA-Fragments.

Die im Experiment verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech-AG (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

2.6.4 Genexpressionsanalyse der Virulenzdeterminanten von *S. aureus*

Verwendet für die PCR der Virulenz-assoziierten Gene (*agr*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *tst*, *hlgA*, *hlgB*, *lukE*, *luk-PV*) von *S. aureus* wurde das *Taq* DNA Polymerase Kit von Qiagen [Ghebremedhin *et al.*, 2005]. Es wurde zumeist ein PCR-Ansatz mit vorwärts- (*forward*) und rückwärts- (*reverse*) Primern von je 100 pmol/μl, 5 mmol/l Desoxynukleotide (dNTPs) (Tabelle 2), 25 mmol/l MgCl₂, 2,5 u *Taq* DNA-Polymerase und 5 μl 10xPuffer mit 5 μl *template*-DNA bzw. bei einer Negativkontrolle 5 μl H₂O zugesetzt [Ghebremedhin *et al.*, 2005]. Insgesamt wurde der Ansatz mit HPLC-Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50 μl aufgefüllt (16,55 μl PCR-Ansatz + 33,45 μl HPLC-Wasser) (PCR-Parameter siehe Tabelle 1). Die Analyse der entstandenen PCR-Produkte fand anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel) statt (Kapitel 2.6.5) [Ghebremedhin *et al.*, 2009].

Tabelle 1: PCR-Parameter zur Detektion von Virulenzgenen (Enterotoxine, Hämolysine, Leukozidine) von *S. aureus*

Gen	Amplifikationszyklus [Ghebremedhin <i>et al.</i> , 2009]
<i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> <i>sed</i> , <i>seg</i> , <i>seh</i> <i>see</i> , <i>sei</i> <i>sej</i> <i>tst</i> <i>hlgA</i> , <i>hlgB</i> , <i>lukE</i>	1 min 95°C; 30 Zyklen: 1 min 95°C → 1 min 55°C → 2 min 72°C; 3 min 72°C
<i>luk-PV</i>	5 min 94°C; 25 Zyklen: 30 s 94°C → 30 s 55°C → 1 min 72°C; 7 min 72°C

Tabelle 2: Oligonukleotide zur Detektion Virulenz-assoziiierter Gene

Gen	Produktgröße (bp)	Oligonukleotide (5' → 3')		Referenz
<i>sea</i>	127	for	CCTTTGGAAACGGTTAAAAACG	[Becker <i>et al.</i> , 1998]
		rev	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	
<i>seb</i>	477	For	TCGCATCAAACCTGACAAAACG	[Becker <i>et al.</i> , 1998]
		Rev	GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC	
<i>sec</i>	271	For	CTCAAGAAGCTAGACATAAAAAGCTAGG	[Becker <i>et al.</i> , 1998]
		Rev	TCAAAAATCGGATTAACACATTATCC	
<i>sed</i>	319	For	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG	[Becker <i>et al.</i> , 1998]
		Rev	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC	
<i>see</i>	178	For	CAGTACCTATAGATAAAAGTTAAAAACAAGC	[Becker <i>et al.</i> , 1998]
		Rev	TAACCTTACCGTGGACCCCTTC	
<i>seg</i>	116	For	AACGYCAACCYGATCCT	[Becker <i>et al.</i> , 2003]
		Rev	CCTCCTTCAACAGGTGGAGAC	
<i>seh</i>	235	For	TTAGAAATCAAGGTGATAGTGGC	[Becker <i>et al.</i> , 2003]
		Rev	TTTTGAATACCATCTACCCAAAC	
<i>sei</i>	330	For	GCCACTTTATCAGGACAATACTT	[Becker <i>et al.</i> , 2003]
		Rev	AAAACCTTACAGGCAGTCCATCTC	
<i>sej</i>	640	For	CTCCCTGACGTTAACACTACTAATAA	[Becker <i>et al.</i> , 2003]
		Rev	TTGTCTGGATATTGACCTATAACATT	
<i>tst</i>	445	For	AAGCCCTTTGTTGCTTGCCG	[Becker <i>et al.</i> , 1998]
		Rev	ATCGAACTTTGGCCCATACTTTT	
<i>hlgA</i>	350	For	ATGATTAATAAATAAATAATTAACAGCAACT	[Bronner <i>et al.</i> , 2000]
		Rev	ATCAACATTAGAGTCTTTTCGTTTTT	
<i>hlgB</i>	940	For	AGCTCTCGAACAACATATTATA	[Bronner <i>et al.</i> , 2000]
		Rev	CTGCAGCTTTAAGCACTAAAG	
<i>lukE</i>	516	For	TAGGCAAATCATCAGTTGCTTCAT	[Bronner <i>et al.</i> , 2000]
		Rev	GTAGTTCTGTAACCTTCTTGTTTT	
<i>luk-PV</i>	433	For	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATC	[Lina <i>et al.</i> , 1999]
		Rev	GCATCAACTGTATTGGATAGCAAAAAGC	

2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel)

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte nach ihrer Länge elektrophoretisch in Agarosegel mit einem Agarosegehalt von 1,5 %. Aufgrund der Zucker-Phosphatbestandteile sind Nukleinsäuren negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zum Pluspol. Die Beweglichkeit eines linearen DNA-Abschnitts ist innerhalb eines bestimmten Größenbereichs dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte proportional [Sambrook *et al.*, 1989].

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Herstellung des Gels 6 g Agarose in Pulverform mit 300 ml 1xTBE-Puffer vermischt und solange in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare Flüssigkeit entstand. In dieser aufgekochten geligen Masse wurden 6 µl Ethydiumbromid gelöst. Etwa 100 ml des flüssigen Agarosegels reichten aus, um ein Elektrophorese-Gel in einer Plexiglaswanne zu gießen. Luftblasen wurden gegebenenfalls entfernt und Gelkämme unterschiedlicher Größe in dieses eingehängt (je nach Bedarf Kämme mit zwölf, 16 oder 20 Zähnen). Die Schichtdicke der Gele betrug letztlich zwischen 5 bis 8 mm.

Nach Erkalten des Agarose-Gels und Entfernen des Kammes – im Gel waren nun vorgeformte Taschen erkennbar –, wurde dieses in der Elektrophoresekammer platziert. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1xTBE-Puffer aufgefüllt, so dass das Gel von diesem bedeckt wurde. Die erste Gel-Tasche wurde immer mit 5 µl des Markers beladen, um später die Basenpaarlängen ablesen zu können, die restlichen Taschen mit jeweils 8 µl des PCR-Amplifikats und 3 µl Loading Dye. Nach Schließen der Kammer erfolgte die Auftrennung bei 180 mV für ca. 20 bis 25 min. Zum Sichtbarwerden der Banden wurde das Gel anschließend mit UV-Licht abfotografiert (UV-Transilluminator *Gel Logic 100 Imaging System*, Programm Kodak 1D v.3.6.1.).

2.6.6 agr-Typisierung von *S. aureus*

Der *agr*-Locus von *S. aureus* kontrolliert die Produktion einiger Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel das TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin 1*) oder Exfoliatin. Durch eine hypervariable Region lässt sich dieser *agr*-Locus in vier Hauptgruppen (I bis IV) einteilen, die wiederum mit Hilfe einer PCR mit *agr*-spezifischen Primern (Tabelle 3) detektierbar sind.

Diese *agr*-Gruppenzuordnung zu den *S. aureus*-Isolaten weist Rückschlüsse auf die Produktion von Toxinen auf. So ist das Vorhandensein der *agr*-Gruppe III mit der Produktion von TSST-1 assoziiert (Auslöser des Toxischen Schock Syndroms), die Exfoliatin-produzierenden *S. aureus*-Isolate gehören hauptsächlich der *agr*-Gruppe IV an (Auslöser generalisierter Erkrankungen wie zum Beispiel: *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*, Lyell-Syndrom, etc.). Bakterienstämme der *agr*-Gruppen I und II lösen meist eine Endokarditis aus [Jarraud *et al.*, 2002].

Verwendet wurde das *Taq* DNA Polymerase Kit von Qiagen [Ghebremedhin *et al.*, 2005]. Für einen 45 µl-PCR-Ansatz wurden vorwärts- (*forward*) und rückwärts- (*reverse*) Primer von je 100 pmol/µl, 5 mmol/l Desoxynukleotide (dNTPs), 25 mmol/l MgCl₂, 2,5 u *Taq* DNA-Polymerase und 5 µl 10xPuffer mit 5 µl *template*-DNA bzw. bei einer Negativkontrolle 5 µl H₂O zugesetzt. Insgesamt wurde der Ansatz mit HPLC-Wasser bis zu einem

Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die Analyse der entstandenen PCR-Produkte fand anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel) statt (Kapitel 2.6.5) [Ghebremedhin *et al.*, 2009].

Tabelle 3: Oligonukleotide zur Detektion der *agr*-Gruppen I-IV

Gen	Produktgröße (bp)	Oligonukleotide (5' → 3')	Referenz
<i>agr</i>		ATGCACATGGTGCACATGC	[Lina <i>et al.</i> , 2003]
<i>agr-1</i>	439	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	
<i>agr-2</i>	572	TATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	
<i>agr-3</i>	321	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	
<i>agr-4</i>	657	CGATAATGCCGTAATACCCG	

PCR-Parameter zur *agr*-Typisierung von *S. aureus* [Ghebremedhin *et al.*, 2009]:

5 min 95°C; 30 Zyklen: 1 min 94°C → 1 min 55°C → 1 min 72°C → 3 min 72°C; 10 min 72°C

2.6.7 Multilocus-Sequenzanalyse und *spa*-Typisierung

Die *Multilocus sequence typing* (MLST) dient der Charakterisierung von Bakterienstämmen oder anderen mikrobiellen Organismen. Dabei werden die Sequenzen von sieben hochkonservierten Regionen, den sogenannten *housekeeping genes*, ermittelt [Enright *et al.*, 2002]. Mit Hilfe dieser Typisierungsmethode lassen sich die *S. aureus*-Isolate bestimmten klonalen Linien zuordnen. Zu den *housekeeping genes* zählen Carbamatkinase (*arcC*), Shikimatdehydrogenase (*aroE*), Glycerinkinase (*glpF*), Guanylatkinase (*gmk*), Phosphatäcetyltransferase (*pta*), Triosephosphatisomerase (*tpi*) und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (*yqiL*).

Ebenso wertvoll zur Informationsgewinnung zeigt sich die *spa*-Sequenzierung. Hierbei findet eine Sequenzanalyse des hochvariablen Bereichs innerhalb des *S. aureus*-Protein A-Gens (*spa*) statt.

Über Internet-basierte Datenbanken ließen sich den *S. aureus*-Isolaten sowohl die MLST- als auch über die StaphRIDOM-Software (StaphType) die *spa*-Typisierung den einzelnen klonalen Linien zuweisen (Kapitel 2.7).

Im Rahmen der PCR wurde das *Taq* DNA Polymerase Kit von Qiagen verwendet. Für einen 45 µl-PCR-Ansatz wurden vorwärts- (*forward*) und rückwärts- (*reverse*) Primer von je 100 pmol/µl, 5 mmol/l Desoxynukleotide (dNTPs) (Tabelle 4), 25 mmol/l MgCl₂, 2,5 u *Taq* DNA-

Polymerase und 5 µl 10xPuffer mit 5 µl *template*-DNA bzw. bei einer Negativkontrolle 5 µl H₂O zugesetzt [Ghebremedhin *et al.*, 2005]. Insgesamt wurde der Ansatz mit HPLC-Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt (PCR-Parameter siehe Tabelle 5). Die Analyse der verschiedenen PCR-Produkte fand in einer Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel) statt (Kapitel 2.6.5) [Ghebremedhin *et al.*, 2009]. Anschließend wurde zum Teil noch eine Sequenzierung durchgeführt.

Tabelle 4: Oligonukleotide zur Genotypisierung von *S. aureus*

Gen	Produktgröße (bp)	Oligonukleotide (5' → 3')	Referenz	
Multisequenzanalyse:				
<i>arcC</i>	456	<i>arcC</i> -UP	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	[Enright <i>et al.</i> , 2002]
		<i>arcC</i> -DN	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aroE</i>	456	<i>aroE</i> -UP	ATCGGAAATCCTATTTTCACATTC	
		<i>aroE</i> -DN	GGTGTGTGATTAATAACGATATC	
<i>glpF</i>	465	<i>glpF</i> -UP	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	
		<i>glpF</i> -DN	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
<i>gmk</i>	429	<i>gmk</i> -UP	ATCGTTTTTATCGGGACCATC	
		<i>gmk</i> -DN	TCATTAACTACAACGTAATCGTA	
<i>pta</i>	474	<i>pta</i> -UP	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	
		<i>pta</i> -DN	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
<i>tpi</i>	402	<i>tpi</i> -UP	TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAA	
		<i>tpi</i> -DN	TTTGCACCTTCTAACAATTGAC	
<i>yqiL</i>	516	<i>yqiL</i> -UP	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC	
		<i>yqiL</i> -DN	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	
spa-Sequenzanalyse:				
<i>spa</i>	variabel	<i>spa</i> -1113f	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	[Harmsen, <i>et al.</i> , 2003]
		<i>spa</i> -1514r	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	

Tabelle 5: PCR-Parameter zur Detektion von *housekeeping genes* von *S. aureus*

Gen	Amplifikationszyklus [Ghebremedhin <i>et al.</i> , 2009]
<i>arc, aroE, glpF, gmk, pta, tpi, yqiL</i>	5 min 95°C; 30 Zyklen: 1 min 95°C → 1 min 55°C → 1 min 72°C; 5 min 72°C
<i>spa</i>	5 min 80°C; 35 Zyklen: 45 s 95°C → 45 s 60°C → 90 s 72°C; 10 min 72°C

2.6.8 SCCmec-Typisierung von MRSA

Die Methicillin-Resistenz von *S. aureus* beruht auf dem Vorhandensein eines bestimmten Genabschnittes namens *mecA*, welches sich eingebettet in dem SCCmec-Genelement (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) befindet [Katayama *et al.*, 2000]. Dabei variiert SCCmec in seiner Zusammensetzung und lässt sich somit in verschiedene Typen I bis IV unterteilen. Die Feststellung dieser Typen wird durch die PCR ermöglicht, die für die Typen spezifische Loci auf- (*upstream*) und abwärts (*downstream*) von *mecA* detektiert.

Tabelle 6: Oligonukleotide zur SCCmec-Typisierung von *S. aureus*

Locus	Primer	Oligonukleotide (5' → 3')	Amplifikatgröße (bp)	Spezifität (SCCmec-Typ)
A	CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	I
	CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
B	KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	II
	KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
C	MECI P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	209	II, III
	MECI P3	GCGGTTTCAATTCACTTGTC		
D	DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	I, II, IV
	DCS R2	CTAAATCATAGCCATGACCG		
E	RIF4 F3	GTGATTGTTCGAGATATGTGG	243	III
	RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
F	RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	III
	RIF5 R13	GTCACAGTAATTCCATCAATGC		
G	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	381	Ia
	pUB110 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC		
H	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	303	III, wenn nicht IIIa
	pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC		
mecA	MECA P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	162	Interne Kontrolle
	MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		

nach [Oliveira and Lencastre, 2002]; [Ma *et al.*, 2002]

Im Rahmen der PCR zur SCCmec-Typisierung von *S. aureus* wurde das Taq DNA Polymerase Kit von Qiagen verwendet. Für einen 45 µl-PCR-Ansatz wurden 200 nmol/l Desoxynukleotide (dNTPs), 25 mmol/l MgCl₂, 2,5 u Taq DNA-Polymerase und 5 µl 10xPuffer benötigt. An vorwärts- (*forward*) und rückwärts- (*reverse*) Primern (Tabelle 6) kamen jeweils hinzu: 400 nmol/l CIF2 F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 R13, pUB110 R1 und pT181 R1; 800 nmol/l DCS F2, DCS R1, MECA P4, MECA P7 und IS431 P4; 200 nmol/l

KDP F1, KDP R1, RIF4 F3 und RIF4 R9. Zuletzt hinzugefügt wurden noch 5 µl *template*-DNA bzw. bei einer Negativkontrolle 5 µl H₂O. Insgesamt wurde der Ansatz mit HPLC-Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt [Oliveira and Lencastre, 2002]. Die Analyse der verschiedenen PCR-Produkte fand in einer Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel) statt (Kapitel 2.6.5).

PCR-Parameter zur SCC*mec*-Typisierung von *S. aureus* [Ghebremedhin *et al.*, 2009]:

4 min 94°C; 30 Zyklen: 30 s 94°C → 30 s 53°C → 1 min 72°C; 4 min 72°C

2.6.9 Aufreinigung von PCR-Produkten mit QIAquick PCR Purification Kit

Da die PCR-Produkte nach stattgefundener Polymerasekettenreaktion mit überschüssigen Primern, Puffersalzen, dNTPs und *Taq*-Polymerase verunreinigt sind, müssen diese zur weiteren Analyse mittels dem Aufreinigungskit QIAquick von Qiagen beseitigt werden. Einer Volumeneinheit der Probe wurden fünf Volumeneinheiten PB-Puffer zugefügt und nach Übertragen auf die Säule für 1 min bei 16.060 u/min zentrifugiert. Um die Silikamembran zu waschen, wurden dem Proben-Puffer-Gemisch 750 µl PE-Puffer hinzugegeben, dieses erneut 1 min lang bei 16.060 u/min zentrifugiert und anschließend wiederum 1 min bei 16.060 u/min zum Trocknen der Membran zentrifugiert. Zur DNA-Extraktion mittels Herauswaschung wurde die Säule in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und zentral auf die QIAquick-Membran 50 µl EB-Puffer appliziert. Bei Raumtemperatur fand eine einminütige Inkubation mit anschließender Zentrifugation bei 16.060 u/min für 1 min statt. Nachfolgend wurde die Säule verworfen, die aufgereinigte DNA befand sich nun im Eppendorfgefäß.

2.6.10 DNA Cycle-Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Ablesung einer Sequenzabfolge eines Gens bzw. DNA-Abschnittes, also dessen Nukleotidabfolge, erfolgt weitestgehend auf den Grundlagen der Methode nach Sanger. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Didesoxymethode nach Sanger, die auch unter der Kettenabbruch-Synthese bekannt ist [Sanger *et al.*, 1992].

Das zu sequenzierende DNA-Fragment wurde zunächst vervielfältigt und mit QIAquick Aufreinigungskits gereinigt (Kapitel 2.6.9).

Durch die *Taq*-Polymerase wurde der DNA-Strang verlängert. Für diese DNA-Strang-Synthese wurden die vier Desoxynukleotide (dNTPs) benötigt, zusätzlich wurden dem

Reaktionsgemisch Didesoxynukleotide (ddNTP) hinzugefügt. Diese lagerten sich rein zufällig während der Synthese an den DNA-Strang an und führten zu einem Abbruch der selbigen. Es entstanden während der PCR durch Wiederholungen der Reaktion DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge mit jeweils der gleichen ddNTP-Endung. Ursprünglich fand die Sequenzierung mit radioaktiv-markierten Nukleotiden statt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Sequenzierung in einem automatisierten Kapillar-Sequenzierer mit Fluoreszenz-markierten Nukleotiden – insgesamt vier verschiedene Farbstoffe – durchgeführt.

Der Computer ist in der Lage, die Sequenz automatisch zu analysieren und stellt diese dann als Chromatogramm und zusätzlich deren Nukleotidabfolge dar [Middendorf *et al.*, 2001]; [Madigan *et al.*, 2003].

Die jeweiligen einzelnen Schritte der Sequenzanalyse werden im Folgenden beschrieben (PCR, *Cycle*-PCR und in Kapitel 2.6.11 die Kapillarelektrophorese).

Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wurde zunächst durch die PCR amplifiziert und anschließend aufgereinigt (Kapitel 2.6.9).

Für die darauffolgende *Cycle*-Sequenzierung wurde das *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem, ABI) verwendet. Der Energieträger und -geber Fluoreszin und ein daran gebundener Akzeptor Dichlorrhodamin bilden die Bestandteile von *BigDyes* [Lee *et al.*, 1997]. Jeweils 140 ng aufgereinigtes Amplifikat, 1 µl des jeweiligen Sequenzierprimers (3,25 nmol/l), 9 µl vom *BigDye-Terminator* (Mix) und H₂O bildeten einen Reaktionsansatz von 20 µl.

Die sich anschließende *Cycle*-PCR bestand aus folgenden 30 Zyklen:

1. thermische Denaturierung bei 96°C für 30 s
2. Primeranlagerung an die DNA-Vorlage bei 54-60°C für 10 s und
3. Amplifizierung bei 60°C für 4 min.

Sowohl die unmarkierten dNTPs als auch die zum Kettenabbruch führenden Fluoreszenz-markierten ddNTPs wurden zum Einbau genutzt. Um die Produkte der *Cycle*-Sequenzierung von überschüssigen Reaktionsprodukten zu befreien, wurde zur Aufreinigung das DyeEx 2.0 Spin Kit (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.6.11 Kapillarelektrophorese für die DNA-Sequenzierung

Um die DNA-Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese auszuwerten, wurden 5 µl aufgereinigtes Produkt der *Cycle*-Sequenzierung mit 15 µl HiDi in einer Mikrotiterplatte gemischt und im *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) analysiert. Dabei wurde das Gemisch aus der Mikrotiterplatte zur Durchführung der Kapillarelektrophorese per Injektion in eine mit einem POP-6-Polymer (PE Biosystems) gefüllte Kapillare überführt. Innerhalb dieser Kapillare wurde die DNA entsprechend ihrer unterschiedlichen Fragmentlänge nach Anlegen der Elektrophorese-Spannung in unterschiedliche Zonen getrennt (*capillary electrophoresis*). Diese Fragmente durchwanderten dabei das Detektorfenster, in dem die Fluoreszenzfarbstoffe von einem Laser angeregt wurden und dadurch Licht unterschiedlicher Wellenlänge aussendeten. Mit Hilfe einer Videokamera ließ sich das spektrographisch zerstreute Licht aufnehmen und sein Signal von der Collection Software speichern. Das *ABI Prism Sequencing Analysis 3.0* (PE Biosystems) Analyseprogramm verrechnete die Ergebnisse miteinander und fügte sie in einem vierfarbigen Elektropherogramm zusammen.

2.7 Auswertung der Sequenzen von MLST und *spa*

2.7.1 Multilocus-Sequenz-Auswertung

Unter Einsatz der beiden Softwareprogramme *ABI Prism Sequencing Analysis 3.0* (Applied Biosystems) und *Assembler* (Applied Biosystems) konnten die gewonnenen Gensequenzen sowohl analysiert wie auch mit der entsprechenden Datenbank zusammengeführt werden. Damit die unterschiedlichen Gensequenzen auch untereinander gegenübergestellt werden konnten, um somit einen Verwandtschaftsgrad zu prüfen, wurden Sequenzvergleiche (*Alignments*) gezogen. Diese betreffen das Anordnen und Ausrichten von mehreren Gensequenzen, wobei die zu untersuchenden Genabfolgen so gegeneinander verschoben wurden, dass eine möglichst große Deckungsgleichheit mit nur wenigen Lücken in der Basenabfolge gegeben war.

Bei der Multilocus Sequenzanalyse (*multilocus sequence typing*, MLST) wird jeder Probe anhand ihrer vorhandenen unterschiedlichen Gensequenzen ein Allelprofil zugeteilt. Ein Gen besteht aus mehreren variablen Nukleotidfolgen, also aus mehreren Allelen. Jedem dieser Allele wird eine Nummer zugeordnet. Fügt man diese Allelnummern der verschiedenen Genloci einer Probe zusammen, ergibt sich das Allelprofil, welchem ein spezifischer Sequenztyp (ST) zugeteilt wird. Auch diese Sequenztypen werden abermals nach Nummern sortiert. Demnach lässt sich die Aussage treffen, dass nah verwandte Isolate auch

annähernd identische Allelprofile mit nur wenigen sich unterscheidenden Genloci bieten [Enright and Spratt, 1999]; [Urwin and Maiden, 2003].

Zur Analyse hinsichtlich der Populationsgenetik oder zur Aufstellung phylogenetischer Stammbäume zeigen die Allelprofile großen Nutzen. Die Aufschlüsselung dieser Methode hängt von der Anzahl und der Art der Gene, der Länge der Sequenzen und dem Grad der Diversität in der untersuchten Art ab [Cooper and Feil, 2004]. Bei der MLST werden die Sequenzen von sieben hochkonservierten Genloci, den *housekeeping genes*, ermittelt (Kapitel 2.6.7) und für diese Allelprofile generiert [Enright *et al.*, 2002]. Mit Hilfe einer Internet-basierten Datenbank (<http://www.mlst.net>) bezieht jedes *S. aureus*-Isolat eine ST (Sequenztyp)-Nummer, die sich auf die Allelnummern der sieben *housekeeping genes* gründet.

2.7.1.1 Erstellung von Stammbäumen – Phylogenie

Mittels der Software DNASIS®MAX Version 2.0.5 (Hitachi Software Engineering, Japan) wurden die Sequenz-Alignments nach dem UPGMA-Algorithmus (*unweighted pair group method using arithmetic averages*) durchgeführt, d.h. die Sequenzunterschiede in den Allelprofilen der verschiedenen *S. aureus*-Isolate wurden mit Hilfe der nicht-gewichteten Paargruppenmethode mit arithmetischen Mittelwerten analysiert. Zur optimalen Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen (Dendrogramm) der Sequenztypen wurde die Software Treeview verwendet, mit der die Ansicht der Stammbäume editiert werden kann. Im Dendrogramm ist der Abstand zwischen zwei *Clustern* der Mittelwert der paarweisen Abstände aller Sequenzen in beiden Clustern, wobei die Ast-Länge zwischen den Clustern proportional zum berechneten phylogenetischen Abstand zwischen diesen ist.

2.7.2 *spa*-Cycle-Sequenzierung und Auswertung

Für einen 20 µl PCR-Ansatz wurden 140 ng DNA des aufgereinigten Amplifikats benötigt. Zunächst musste jedoch der tatsächliche DNA-Gehalt des Amplifikats mit dem NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) nach Angaben des Geräteherstellers bestimmt werden. Erst anschließend ließ sich für jede Probe mittels einer Dreisatzrechnung berechnen, wie viele Mikroliter einem 140 ng-Gehalt entsprechen.

$$\frac{140 \text{ ng}}{X \text{ } \mu\text{l}} = \frac{Y \text{ ng}}{1 \text{ } \mu\text{l}}$$

$$\rightarrow X \text{ } \mu\text{l} = \frac{140 \text{ ng}}{Y \text{ ng}}$$

Es gilt: $Y \text{ ng}$ → tatsächlicher DNA-Gehalt des aufgereinigten Amplifikats in
1 μl -Volumen
 140 ng → gewünschter DNA-Gehalt
 $X \mu\text{l}$ → Volumen mit einem DNA-Gehalt von 140 ng

Nach Berechnung des Volumens wurde dieses dem PCR-Ansatz hinzugefügt, des Weiteren folgten 3 μl ABI Prism Big Dye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems), 3 μl Tris/HCl/MgCl₂-Puffer (400 mmol/l Tris-HCl; 10 mmol/l MgCl₂) und 10 pmol von einem der beiden Primer.

Die sich anschließende *spa-Cycle-PCR* bestand aus folgenden 25 Zyklen:

1. thermische Denaturierung bei 96°C für 10 s
2. Primeranlagerung an die DNA-Vorlage bei 60°C für 45 s und
3. Amplifizierung bei 60°C für 4 min.

Eine Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte erfolgte mit den DyeEx-Säulen (Qiagen, Hilden). Zur Sequenzauswertung wurden diese auf dem *ABI 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers vorbereitet und aufgetrennt, sodass ihre Repeat-Regionen nachfolgend mit der *Ridom StaphType Software* (Ridom GmbH, Würzburg) bestimmt werden konnten.

2.8 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen erfolgten durch Auszählung und Berechnung prozentualer Anteile (zum Teil mit 95%-Konfidenzintervall nach der Clopper-Pearson-Methode). Weiterhin wurden Abhängigkeiten zwischen verschiedenen Größen im Chi-Quadrat-Test geprüft.

Statistische Tests erfolgten im explorativen Sinne. Testergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Die statistische Berechnung erfolgte mittels SPSS Version 21 mit Unterstützung vom Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

3. Ergebnisse

3.1 Verteilung der *S. aureus*-Isolate Panamas auf MRSA und MSSA

119 *S. aureus*-Isolate wurden aus unterschiedlichen klinischen Abstrichmaterialien, Blutproben, Punktaten und Gewebeproben in den Jahren 2008 bis 2010 im Universitätsklinikum Hospital Santo Tomás in Panama City, Panama gewonnen. 101 Isolate (84,9 %; 95%-Konfidenzintervall nach der Clopper-Pearson-Schätzung [77,2; 90,8]) wurden als MRSA detektiert, bei den restlichen 18 Isolaten (15,1 %; 95%-Konfidenzintervall [9,2; 22,8]) handelte es sich dementsprechend um Methicillin-empfindliche *S. aureus* (MSSA) (Abbildung 6).

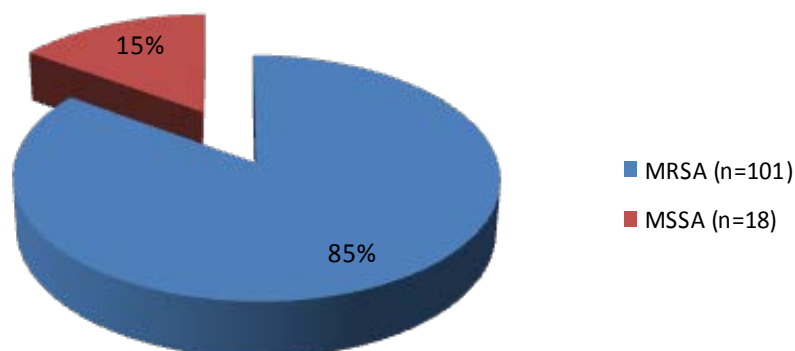


Abbildung 6: Verteilung der Methicillin-empfindlichen (MSSA) sowie -resistenten (MRSA) *S. aureus*-Isolate Panamas ($n = 119$)

3.2 Antimikrobielle Resistenzen der MSSA- und MRSA-Isolate

Die Testung auf Antibiotika-Empfindlichkeit ergab, dass die MRSA-Isolate zusätzliche Resistenzen gegenüber anderen Antibiotika-Gruppen aufwiesen. Auch die MSSA-Isolate zeigten teilweise verminderte Empfindlichkeiten auf. Tabelle 7 stellt die unterschiedlichen Resistenzverteilungen der MSSA- und MRSA-Isolate Panamas gegen Antibiotika dar.

Die MRSA-Isolate zeigten hohe Resistenzraten gegen Erythromycin (74,26 %), Clindamycin, Moxifloxacin (jeweils 70,30 %), Fusidinsäure (77,23 %) und Levofloxacin (78,22 %). Bei den MSSA-Isolaten wären eine starke Resistenz gegen Penicillin (77,78 %) und Fusidinsäure (55,56 %) hervorzuheben. Alle Isolate waren gegen Fosfomycin, Linezolid und Rifampicin empfindlich; MSSA zusätzlich noch gegen Gentamicin und Tobramycin.

Tabelle 7: Antibiotika-Resistenzen der MSSA- und MRSA-Isolate

Antibiotikum	MSSA (n = 18)	MRSA (n= 101)
Penicillin (PEN)	77,78 %	100,00 %
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol (SXT)	5,56 %	8,91 %
Tetrazyklin (TET)	16,62 %	41,59 %
Erythromycin (ERY)	28,78 %	74,26 %
Clindamycin (CLI)	11,11 %	70,30 %
Moxifloxacin (MOX)	5,56 %	70,30 %
Gentamicin (GEN)	0,00 %	6,93 %
Fosfomycin (FOS)	0,00 %	0,00 %
Fusidinsäure (FUS)	55,56 %	77,23 %
Levofloxacin (LEV)	11,11 %	78,22 %
Linezolid (LIN)	0,00 %	0,00 %
Rifampicin (RIF)	0,00 %	0,00 %
Tobramycin (TOB)	0,00 %	51,49 %

3.3 Resistenzphänotypen der *S. aureus*-Isolate

Im nächsten Schritt wurde der Resistenzphänotyp der MSSA- ($n = 18$) und MRSA-Isolate ($n = 101$) bestimmt. Unter den insgesamt neun aufgefundenen Resistenzphänotypen der MSSA-Isolate konnten knapp 40 % mit dem Typ PEN-FUS (7 von 18 MSSA-Isolaten) identifiziert werden. Gut ein Fünftel ($4/18 = 22,22$ %) wiesen allein eine Resistenz gegen Penicillin auf. Ein Isolat zeigte sogar gegen alle getesteten Antibiotika eine Sensibilität. Den restlichen sechs Resistenzphänotypen konnte jeweils nur ein MSSA-Isolat zugeordnet werden. Die Verteilung der einzelnen detektierten Muster an Resistenzphänotypen für die MSSA-Isolate aus Panama zeigt Tabelle 8.

Bei den MRSA-Isolaten konnten dagegen insgesamt 24 verschiedene Resistenzphänotypen ausgemacht werden. Knapp ein Viertel der Isolate ($26/101 = 25,74$ %) wiesen einen Resistenzphänotyp PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB auf. Bei 17 Isolaten konnte das Resistenzprofil PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-FUS detektiert werden (16,83 %), neun weitere zeigten zudem noch eine zusätzliche Resistenz gegen Tobramycin (insgesamt 8,91 % aller Isolate mit dem Resistenzphänotyp PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV-TOB). Lediglich vier MRSA-Isolate (3,96 %) waren neben einer Penicillin- und Oxacillinresistenz nur gegen ein zusätzliches Antibiotikum (Tetracyclin) resistent. Vierzehn weitere MRSA-Isolate besaßen eine Resistenz gegenüber zwei zusätzlichen Antibiotika. Die Verteilung der

einzelnen detektierten Resistenzprofile für die Isolate aus Panama zu *SCCmec* und *agr* ist in Kapitel 3.9, Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 8: Antibiotika-Resistenzphänotypen der MSSA-Isolate ($n = 18$)

Resistenzphänotyp	Gesamtzahl (n)	Anteil (%)
PEN	4	22,22
PEN-TET	1	5,56
PEN-ERY	1	5,56
PEN-FUS	7	38,89
PEN-TET-ERY	1	5,56
TET-ERY	1	5,56
ERY-MOX-LEV	1	5,56
SXT-ERY-CLI-FUS-LEV	1	5,56
gegen alle Antibiotika sensibel	1	5,56

PEN = Penicillin; SXT = Trimethoprim/Sulfamethoxazol; TET = Tetracyclin; ERY = Erythromycin; CLI = Clindamycin; MOX = Moxifloxacin; FUS = Fusidinsäure; LEV = Levofloxacin

3.4 Analyse der *agr*-Typisierung der *S. aureus*-Isolate

Der *agr*-Locus von *S. aureus* kontrolliert die Produktion von Virulenzfaktoren. Durch eine hypervariable Region lässt sich dieser *agr*-Locus in vier Hauptgruppen (I – IV) einteilen. Mittels PCR mit *agr*-Gruppen-spezifischen Primern sind diese detektierbar (Abbildung 7).

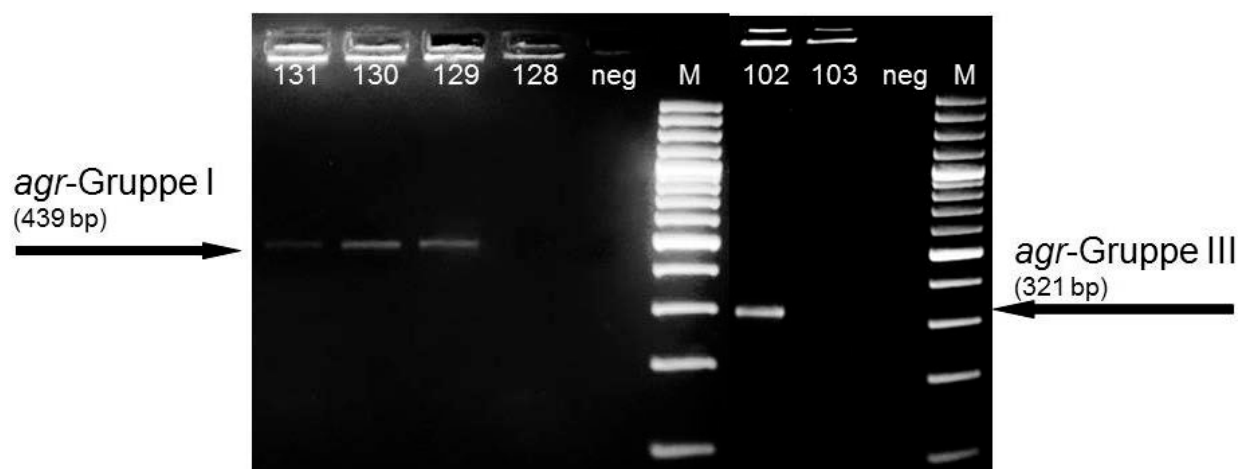


Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel); PCR zum Nachweis des *agr*-Locus einer Auswahl an *S. aureus*-Isolaten (Proben 102, 103, 128, 129, 130, 131 und zwei Negativproben neg, M = Marker). Hier nachgewiesen: *agr*-Gruppe I bei 439 bp und *agr*-Gruppe III bei 321 bp.

Unter den *S. aureus*-Isolaten konnten die *agr*-Gruppen *agr* I (81,51 %), *agr* III (16,81 %) und *agr* IV (1,68 %) detektiert werden. *Agr* II war nicht nachweisbar, bei den MRSA-Isolaten konnte zusätzlich auch *agr* IV nicht identifiziert werden.

3.5 Analyse der Toxingene der *S. aureus*-Isolate

Für das besonders weite Ausmaß an Vorkommen epidemischer MRSA-Isolate werden ihre Ausstattung mit verschiedenen Toxingenen und bestimmte Umweltfaktoren verantwortlich gemacht. Um einer Ausbreitung von MRSA entgegenzuwirken, müssen bestimmte Präventivmaßnahmen durchgeführt werden. Die *agr*-Gruppenzuordnung lässt Rückschlüsse auf die Expression von Toxinen/Exoproteinen zu, da *agr* als „globaler Regulator“ wirkt. Zu den Toxingenen gehören und wurden mittels PCR analysiert: *sea*, *seb*, *sec* (Abbildung 8), *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* (Abbildung 9), *sej*, *tst*, *hlgA*, *hlgB*, *lukE* (Abbildung 10) und das Panton-Valentine-Leukozidin-Gen (*luk-PV*) (Abbildung 11).

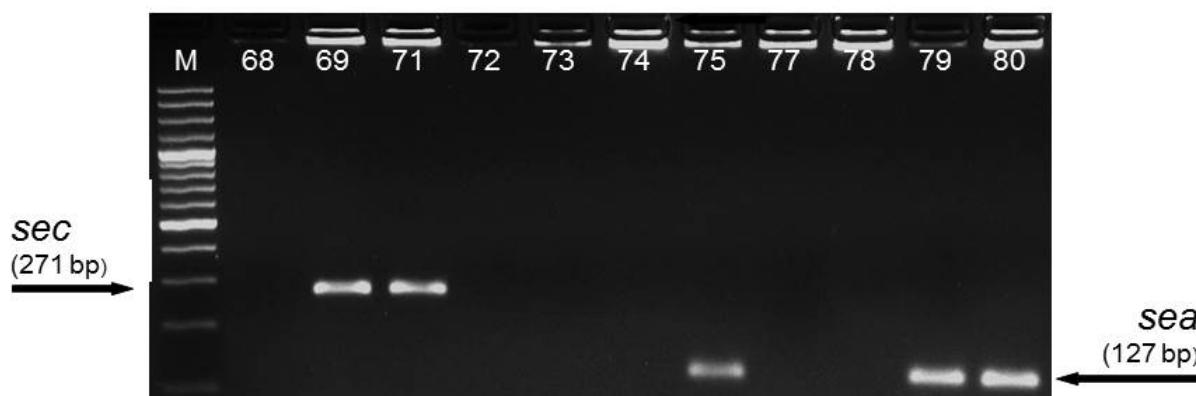


Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel); PCR zum Nachweis der Enterotoxine *sea* bei 127 bp, *seb* bei 477 bp und *sec* bei 271 bp einer Auswahl an *S. aureus*-Isolaten (Proben 68-80; M = Marker).

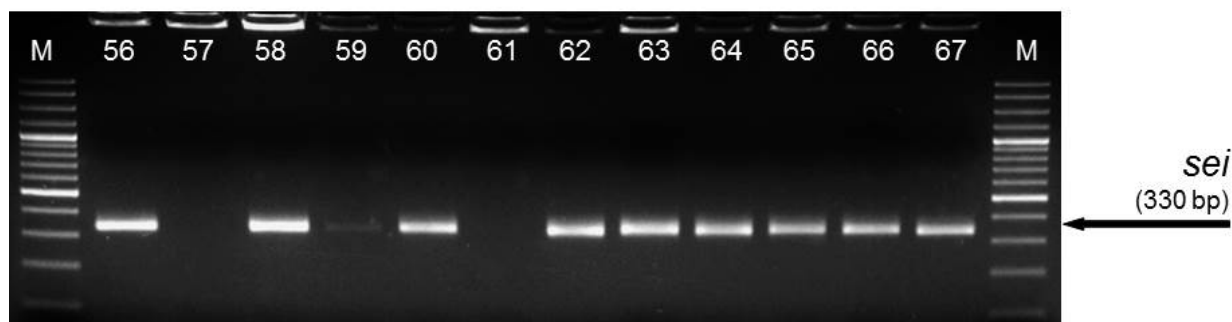


Abbildung 9: Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel); PCR zum Nachweis der Enterotoxine *see* bei 178 bp und *sei* bei 330 bp einer Auswahl an *S. aureus*-Isolaten (Proben 56-67; M = Marker).

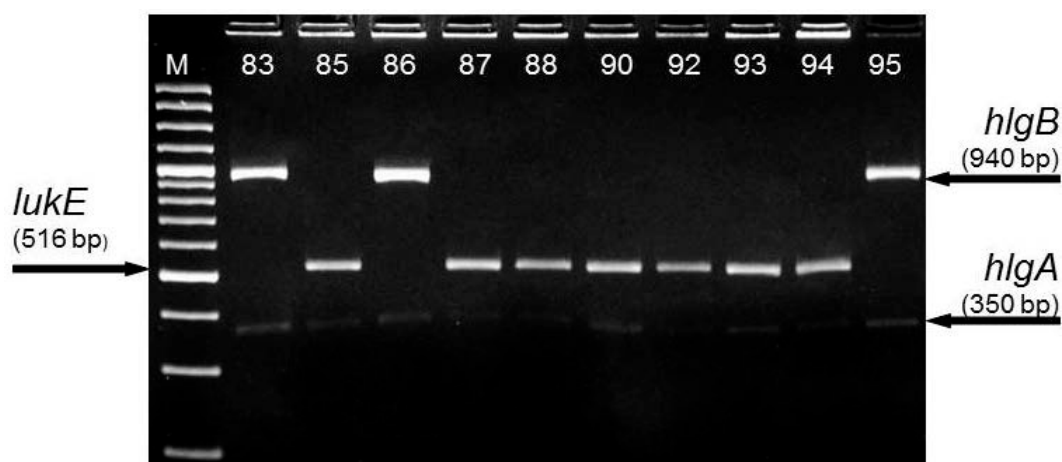


Abbildung 10: Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel); PCR zum Nachweis von *hlgA* bei 350 bp, *hlgB* bei 940 bp und *lukE* bei 516 bp einer Auswahl an *S. aureus*-Isolaten (Proben 83-95; M = Marker).

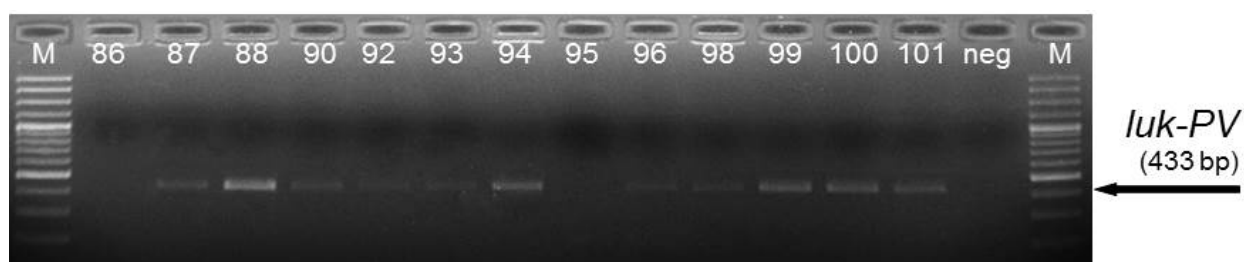


Abbildung 11: Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel); PCR zum Nachweis des Panton-Valentine-Leukozidin-Gen (*luk-PV*) bei 433 bp einer Auswahl an *S. aureus*-Isolaten (Proben 86-101 und einer Negativprobe neg; M = Marker).

In 29 MRSA-Isolaten wurde das Toxingen *sea* detektiert, welches lediglich von MRSA-Isolaten mit dem *SCCmec*-Typ IV nachgewiesen wurde. Das Toxingen *sei* konnte in 56 Isolaten nachgewiesen werden, wobei 36 der 56 *sei*-positiven dem *SCCmec*-Typ I zugeordnet werden konnten. Die weiteren *SE*-Toxingene verteilten sich wie folgt: Zwei MRSA-Isolate waren positiv für *seb*, 14 Isolate für *sec*, nur ein Isolat für *see* (es handelte sich hierbei um ein MRSA-Isolat mit dem *SCCmec*-Typ IV), wohingegen 22 Isolate für *seg* und drei Isolate für *seh* positiv waren. Diese drei *seh*-positiven Isolate wurden nur vom *SCCmec*-Typ I exprimiert. Bei *sed* und *sej* handelt es sich um Toxingene, die von keinem MRSA-Stamm exprimiert wurden.

Hinsichtlich der Hämolyse und Leukozidine wurde in 70 MRSA-Isolaten *hlgA* nachgewiesen, in 23 Isolaten *hlgB*, in 68 Isolaten *lukE* und in 69 Isolaten das *luk-PV*-Gen. Die Gene *lukE* und *luk-PV* wurden vorwiegend von MRSA-Isolaten vom Typ *SCCmec* IV

detektiert. Die Detektionsrate von *luk-PV* lag bei den MRSA-Isolaten aus Panama bei 69/101 = 68,32 %. Ein Nachweis des Panton-Valentine-Leukozidin-Gens stellt einen Hinweis auf einen *community-acquired* MRSA-Stamm dar. Es wurde nachgewiesen, dass bei den CA-MRSA *luk-PV* häufiger als bei nosokomialen Isolaten anzutreffen ist.

Die Toxingene der Isolate lassen sich in verschiedene Profile einteilen (Tabelle 9). Ein Zusammenhang zwischen den Toxingen-Profilen und Resistenzphänotypen konnte nicht festgestellt werden. Das am häufigsten vorkommende Toxingen-Profil mit einem Anteil von 14,85 % (15 von 101 Isolaten) war „*sea, hlgA, lukE, luk-PV*“, gefolgt von „*sei, hlgA, hlgB*“ und „*seg, sei, hlgA, hlgB*“ mit jeweils 7,92 % (8/101).

Tabelle 9: Die wichtigsten Toxingen-Profile der MRSA-Isolate aus Panama

Toxingen-Profil	Gesamtzahl (n)	Anteil (%)
<i>sea, lukE, luk-PV</i>	3	2,97
<i>sea, hlgA, lukE, luk-PV</i>	15	14,85
<i>sea, sei, hlgA, lukE, luk-PV</i>	4	3,96
<i>sec, sei, hlgA, lukE, luk-PV</i>	5	4,95
<i>sec, seg, sei, hlgA, lukE, luk-PV</i>	4	3,96
<i>seg, sei, hlgA, hlgB</i>	8	7,92
<i>seg, sei, hlgA, lukE, luk-PV</i>	7	6,93
<i>sei, hlgA, hlgB</i>	8	7,92
<i>sei, lukE, luk-PV</i>	4	3,96
<i>sei, hlgA, lukE, luk-PV</i>	6	5,94
<i>tst, lukE, luk-PV</i>	4	3,96

Auch für die Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Isolate ließen sich anhand der Detektion der Toxingene (*sea-see, seg-sej, tst, hlgA, hlgB, lukE und luk-PV*) verschiedene Profile erstellen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 10. Das am häufigsten vorkommende Toxingen-Profil mit einem Anteil von 16,67 % (3 von 18 Isolaten) war „*sea, seh, hlgA, lukE, luk-PV*“, gefolgt von „*seg, tst, hlgA, lukE, luk-PV*“ und „*lukE, luk-PV*“ mit jeweils 11,11 % (2/18). In MSSA-Isolaten nicht nachgewiesene Toxingene waren *seb, sec, sed, see* und *sej*.

Mit 77,78 % (14 von 18 Isolaten) ließ sich bei den MSSA-Isolaten aus Panama eine durchaus hohe Exprimierungsrate vom Panton-Valentine-Leukozidin-Gen (*luk-PV*) finden.

Tabelle 10: Einteilung der MSSA-Isolate aus Panama in Toxingen-Profile ($n = 18$)

Toxingen-Profil	Gesamtzahl (n)	Anteil (%)
<i>sea, seh, hlgA, lukE, luk-PV</i>	3	16,67
<i>sea, seh, sei, lukE, luk-PV</i>	1	5,56
<i>sea, seh, sei, hlgA, lukE, luk-PV</i>	1	5,56
<i>sea, tst, hlgA, lukE, luk-PV</i>	1	5,56
<i>seg, tst, hlgA, lukE, luk-PV</i>	2	11,11
<i>seg, sei, hlgA, hlgB</i>	1	5,56
<i>seg, sei, hlgA, lukE, luk-PV</i>	1	5,56
<i>seh, tst, hlgA, lukE, luk-PV</i>	1	5,56
<i>sei, lukE</i>	1	5,56
<i>sei, lukE, luk-PV</i>	1	5,56
<i>tst, hlgA, lukE, luk-PV</i>	1	5,56
<i>hlgA, lukE</i>	1	5,56
<i>lukE</i>	1	5,56
<i>lukE, luk-PV</i>	2	11,11

3.6 Klonale Verteilung der *S. aureus*-Isolate

3.6.1 Klonale Verteilung der MRSA-Isolate

Um mehr über die klonale Zugehörigkeit bzw. die Verteilung der aus Panama stammenden *S. aureus*-Isolate zu erfahren, wurde mit Hilfe des *Multilocus Sequence Typing* (MLST) der genetische Hintergrund untersucht.

Für die MRSA-Isolate ergaben sich folgende Sequenztypverteilungen: Die vorherrschenden Sequenztypen (STs) waren der „USA300“-Stamm ST8 (39/101 = 38,61 %), gefolgt vom „Berliner Stamm“ ST45 (26/101 = 25,74 %). Des Weiteren konnte bei den MRSA-Isolaten ST72 bestimmt werden (20/101 = 19,80 %), ebenso der „New York“-/„Japan-Klon“ ST5 (12/101 = 11,88 %) und der „USA1000“-Stamm ST59 (4/101 = 3,96 %).

Siebzehn der 39 ST8-Isolate (41,03 %) wiesen phänotypisch ein breites Resistenzprofil der Kombination PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV auf. Unter den ST45-MRSA-Isolaten waren elf von 26 (42,31 %) mit einem ebenfalls breiten Resistenzphänotyp PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB vertreten. Die ST5-Isolate zeigten sogar einheitlich dieses Muster (100 % von ST5 mit PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB) (Tabelle 11).

Tabelle 11: Resistenzphänotypen der detektierten MRSA-Sequenztypen – die häufigsten Resistenzphänotypen für ST5, ST8, ST45 und ST72 sind markiert

Resistenzphänotyp (n)	ST5	ST8	ST45	ST59	ST72
PEN-OXA-TET (n = 4)				1	3
PEN-OXA-TET-FUS (n = 11)		1		1	9
PEN-OXA-TET-ERY (n = 2)				2	
PEN-OXA-TET-ERY-FUS (n = 2)		1			1
PEN-OXA-TET-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV (n = 1)		1			
PEN-OXA-TET-FUS-GEN-TOB (n = 3)					3
PEN-OXA-FUS-LEV (n = 1)					1
PEN-OXA-MOX-FUS-LEV (n = 3)		3			
PEN-OXA-MOX-FUS-LEV (n = 2)		2			
PEN-OXA-ERY-MOX-FUS-LEV (n = 1)		1			
PEN-OXA-ERY-CLI-LEV-TOB (n = 4)			4		
PEN-OXA-ERY-CLI-FUS-LEV-TOB (n = 1)			1		
PEN-OXA-ERY-CLI-FUS-LEV (n = 2)					2
PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB (n = 26)	12	2	11		1
PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV (n = 17)		17			
PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV-TOB (n = 9)		3	6		
PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-GEN-LEV-TOB (n = 2)		1	1		
PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-GEN-FUS-LEV-TOB (n = 2)		2			
PEN-OXA-SXT-FUS-LEV (n = 1)		1			
PEN-OXA-SXT-MOX-FUS-LEV (n = 1)		1			
PEN-OXA-SXT-ERY-CLI-FUS-LEV (n = 1)		1			
PEN-OXA-SXT-ERY-CLI-FUS-LEV-TOB (n = 2)		2			
PEN-OXA-SXT-ERY-CLI-LEV-TOB (n = 3)			3		
Gesamtzahl (n = 101)	12	39	26	4	20

ST = analysierter Sequenztyp; PEN = Penicillin; OXA = Oxacillin; SXT = Trimethoprim/Sulfamethoxazol; TET = Tetracyclin; ERY = Erythromycin; CLI = Clindamycin; MOX = Moxifloxacin; GEN = Gentamicin; FUS = Fusidinsäure; LEV = Levofloxacin; TOB = Tobramycin

Inwieweit bei den MRSA-Isolaten ein signifikanter Zusammenhang zwischen bestimmten Resistenzphänotypen und ST-Gruppen besteht, zeigt die folgende Tabelle 12. Zur besseren Übersicht wurden die wichtigsten Resistenzphänotypen in größere Gruppen zusammengefasst und die statistische Signifikanz mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass ein MRSA-Isolat nun mehreren zusammengefassten Resistenzphänotyp-Gruppen angehören kann. Bei der Berechnung wurden jeweils die

Isolate einer Gruppe gegen die restlichen Isolate hinsichtlich der Aufteilung in die ST-Gruppen verglichen.

Tabelle 12: Abhängigkeiten von Resistenzphänotyp-Gruppen zu ST-Gruppe der detektierten MRSA-Isolate. Berechnet wurden die p-Werte mit dem Chi-Quadrat-Test (im Vergleich die jeweilige Resistenzphänotypgruppe zu den restlichen MRSA-Isolaten).

Resistenzphänotyp-Gruppen (n)	ST5	ST8	ST45	ST59	ST72	p-Wert
PEN-OXA-TET* (n = 23)		3		4	16	< 0,001
PEN-OXA-ERY-CLI* (n = 70)	12	29	26		3	< 0,001
PEN-OXA-SXT* (n = 8)		5	3			0,288
PEN-OXA-GEN* (n = 7)		3	1		3	0,453
PEN-OXA-TOB* (n = 52)	12	10	26		4	< 0,001
Gesamtzahl Isolate (n = 101)	12	39	26	4	20	

3.6.2 Klonale Verteilung der MSSA-Isolate

Bei der MLST konnten unter den MSSA-Isolaten die Sequenztypen ST1 (7/18 = 38,89 %), ST5 (1/18 = 5,56 %), ST8 (4/18 = 22,22 %), ST45 (1/18 = 5,56 %), ST59 (1/18 = 5,56 %), ST72 (1/18 = 5,56 %) und ST188 (1/18 = 5,56 %) ausgemacht werden. Bei zwei MSSA-Isolaten war es nicht möglich, einen Sequenztyp zuzuordnen (11,11 %). Tabelle 13 zeigt die Verteilung von Resistenzphänotyp und detektiertem Sequenztyp.

Tabelle 13: Resistenzphänotypen der detektierten MSSA-Sequenztypen

Resistenzphänotyp (n)	ST1	ST5	ST8	ST45	ST59	ST72	ST188
PEN (n = 4)	2		2				
PEN-TET (n = 1)			1				
PEN-ERY (n = 1)	1						
PEN-FUS (n = 5)	4		1				
PEN-TET-ERY (n = 1)						1	
TET-ERY (n = 1)					1		
ERY-MOX-LEV (n = 1)				1			
SXT-ERY-CLI-FUS-LEV (n = 1)							1
gegen alle Antibiotika sensibel (n = 1)		1					
Gesamtzahl (n = 16)	7	1	4	1	1	1	1

ST = analysierter Sequenztyp; PEN = Penicillin; SXT = Trimethoprim/Sulfamethoxazol; TET = Tetracyclin; ERY = Erythromycin; CLI = Clindamycin; MOX = Moxifloxacin; FUS = Fusidinsäure; LEV = Levofloxacin

Um eine Aussage über Abhängigkeiten zwischen Resistenzphänotypen und ST-Gruppen der MSSA-Isolate treffen zu können, wurden für diese ebenfalls p-Werte mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet und in Tabelle 14 dargestellt. Es wurden wieder jeweils die Isolate eines Resistenzphänotyps gegen die restlichen MSSA-Isolate verglichen. Dabei wurden die Penicillin-resistenten MSSA-Isolate zusammengefasst. Diese MSSA-Isolate unterschieden sich signifikant ($p = 0,003$) zu den Penicillin-sensiblen hinsichtlich der Aufteilung in die ST-Gruppen. Bei den anderen Resistenzphänotypen ist kein Zusammenhang nachweisbar, allerdings sind diese Gruppen auch sehr klein.

Tabelle 14: Abhängigkeiten von Resistenzphänotypen zu ST-Gruppe der detektierten MSSA-Isolate. Berechnet wurden die p-Werte mit dem Chi-Quadrat-Test.

Resistenzphänotyp (<i>n</i>)	ST1	ST5	ST8	ST45	ST59	ST72	ST188	p-Wert
PEN* (<i>n</i> = 12)	7		4			1		0,003
TET-ERY (<i>n</i> = 1)					1			0,313
ERY-MOX-LEV (<i>n</i> = 1)				1				0,313
SXT-ERY-CLI-FUS-LEV (<i>n</i> = 1)							1	0,313
gegen alle Antibiotika sensibel (<i>n</i> = 1)		1						0,313
Gesamtzahl (<i>n</i> = 16)	7	1	4	1	1	1	1	

3.7 Zuordnung von Sequenztyp zu *agr*-Gruppe

In der MRSA-Population wurden die *agr*-Gruppen II und IV nicht gefunden. Die ST5-MRSA-Isolate gehörten allesamt zur *agr*-Gruppe III, alle anderen MRSA-Epidemiestämme (ST8, ST45, ST59 und ST72) konnten *agr* I zugewiesen werden. In Tabelle 15 wurde den nachgewiesenen Sequenztypen der MRSA-Isolate die *agr*-Gruppe zugeordnet.

Tabelle 15: Analyse des *agr*-Locus für die ermittelten MRSA-Sequenztypen

MLST (<i>n</i>)	Anzahl der MRSA-Isolate (<i>n</i>)	
	<i>agr</i> I	<i>agr</i> III
ST5 (<i>n</i> = 12)		12
ST8 (<i>n</i> = 39)	39	
ST45 (<i>n</i> = 26)	26	
ST59 (<i>n</i> = 4)	4	
ST72 (<i>n</i> = 20)	20	
Gesamtzahl (<i>n</i> = 101)	89	12

Im Regelfall kann eine ST-Gruppe auch mehreren *agr*-Gruppen zugeordnet werden. Bei den Isolaten aus Panama war dies nicht der Fall. Es zeigte sich hier eine deutliche Abhängigkeit der beiden Gruppen voneinander. Auch statistisch lässt sich diese mit hoher Sicherheit nachweisen.

Ebenso signifikant war die Abhängigkeit von ST- zu *agr*-Gruppe bei den MSSA-Isolaten. Alle ST1- und ST5-MSSA-Isolate gehörten zur *agr*-Gruppe III, alle anderen MSSA-Sequenztypen (ST8, ST45, ST59, ST72 und ST188) konnten *agr* I zugewiesen werden. Die Gruppe *agr* IV wurde insgesamt zwei Mal ermittelt, konnte allerdings keinem ST zugewiesen werden. Tabelle 16 geht auf die nachgewiesenen *agr*-Gruppen mit ihrer Zuordnung zu den ermittelten Sequenztypen der MSSA-Isolate ein.

Tabelle 16: Analyse des *agr*-Locus für die ermittelten MSSA-Sequenztypen

MLST (<i>n</i>)	Anzahl der MSSA-Isolate (<i>n</i>)		
	<i>agr</i> I	<i>agr</i> III	<i>agr</i> IV
ST1 (<i>n</i> = 7)		7	
ST5 (<i>n</i> = 1)		1	
ST8 (<i>n</i> = 4)	4		
ST45 (<i>n</i> = 1)	1		
ST59 (<i>n</i> = 1)	1		
ST72 (<i>n</i> = 1)	1		
ST188 (<i>n</i> = 1)	1		
unbekannt (<i>n</i> = 2)			2
Gesamtzahl (<i>n</i> = 18)	8	8	2

3.8 *spa*-Typisierung der *S. aureus*-Isolate

3.8.1 *spa*-Typisierung der MRSA-Isolate

Über die StaphRIDOM-Software (StaphType) ließ sich den Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolaten die *spa*-Typisierung den einzelnen Bakterienstämmen zuweisen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Zuordnung der detektierten *spa*-Typen zu den jeweiligen nachgewiesenen MRSA-Sequenztypen

<i>spa</i> -Typ	Anzahl	MLST				
		ST5	ST8	ST45	ST59	ST72
t004	26			26		
t008	38		38			
t024	1		1			
t148	20					20
t216	3				3	
t443	12	12				
t444	1				1	
Gesamtzahl	101	12	39	26	4	20

Es zeigte sich bei den MRSA-Isolaten eine signifikante Abhängigkeit zwischen *spa*-Typ und ST-Gruppe ($p < 0,001$).

Alle 26 ST45-MRSA-Isolate ($26/101 = 25,74\%$) gehörten dem *spa*-Typ t004 mit der Repeat-Abfolge 09-02-16-13-13-17-34-16-34 an (Abbildung 12). Ähnlich gute Zuordnungsmöglichkeiten gab es bei den ST8-Isolaten. Der *spa*-Typ t008 mit der Repeat-Abfolge 11-19-12-21-17-34-22-25 konnte bei 38 MRSA-Isolaten ($38/101 = 37,62\%$) nachgewiesen werden (Abbildung 13), eines wurde t024 zugeschrieben ($1/101 = 0,99\%$). Bei ST72 wurde der *spa*-Typ t148 nachgewiesen ($20/101 = 19,80\%$; Repeat-Abfolge 07-23-12-21-12-17-12-12-17; Abbildung 14) und ST5 konnte dem *spa*-Typ t443 zugeordnet werden ($12/101 = 11,88\%$; 26-23-17-20-17-12-12-12-17-16; Abbildung 15). Der MRSA-Stamm ST59 allerdings wurde zwei *spa*-Typen zugeordnet; drei Mal ($3/101 = 2,97\%$) dem Typ t216 mit der Repeat-Abfolge 04-20-17-20-17-31-16-34 und einmal ($1/101 = 0,99\%$) dem Typ t444 mit der Repeat-Abfolge 04-20-17-20-17-31-16 (Abbildung 16). Bei dem *spa*-Typ t216 ist im Vergleich zu t444 eine Addition in der Repeat-Abfolge zu verzeichnen (+ 34; siehe gelber Pfeil in Abbildung 16).

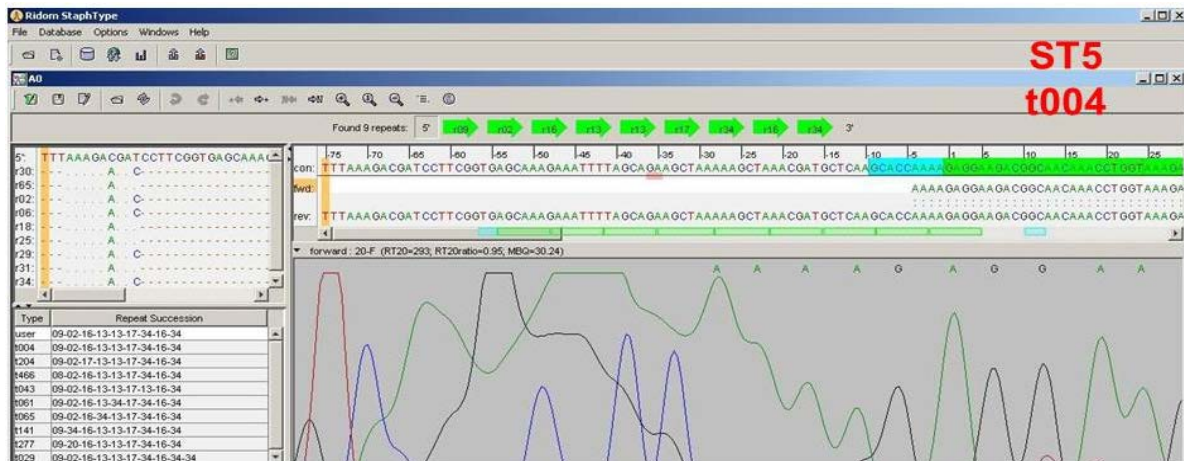


Abbildung 12: spa-Typ t004 mit der Repeat-Abfolge 09-02-16-13-13-17-34-16-34

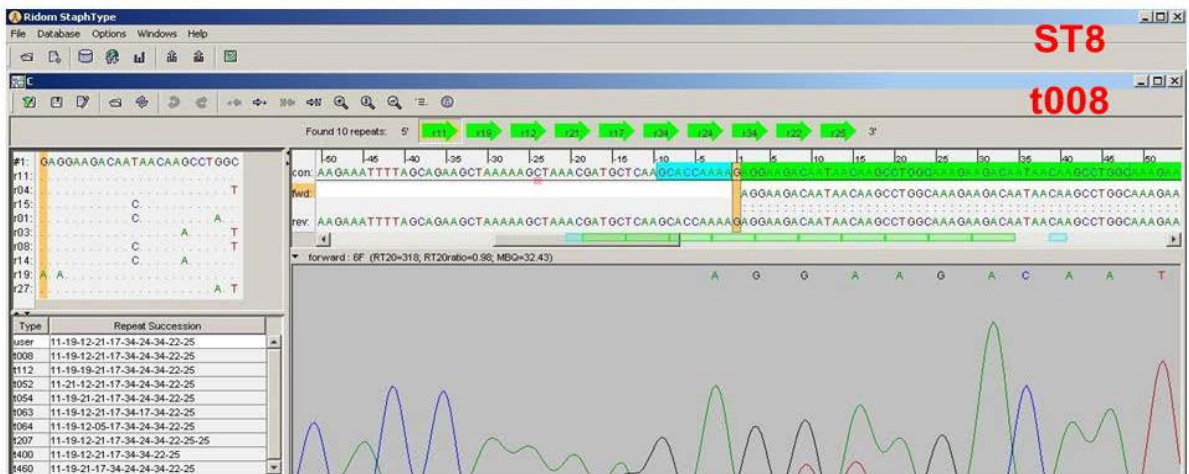


Abbildung 13: spa-Typ t008 mit der Repeat-Abfolge 11-19-12-21-17-34-22-25

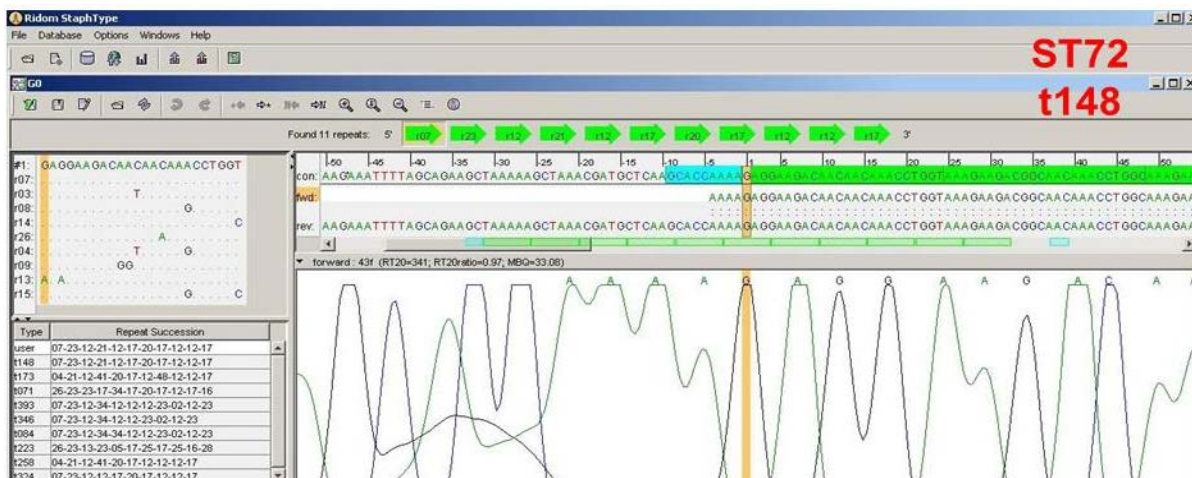


Abbildung 14: spa-Typ t148 mit der Repeat-Abfolge 07-23-12-21-12-17-12-12-17

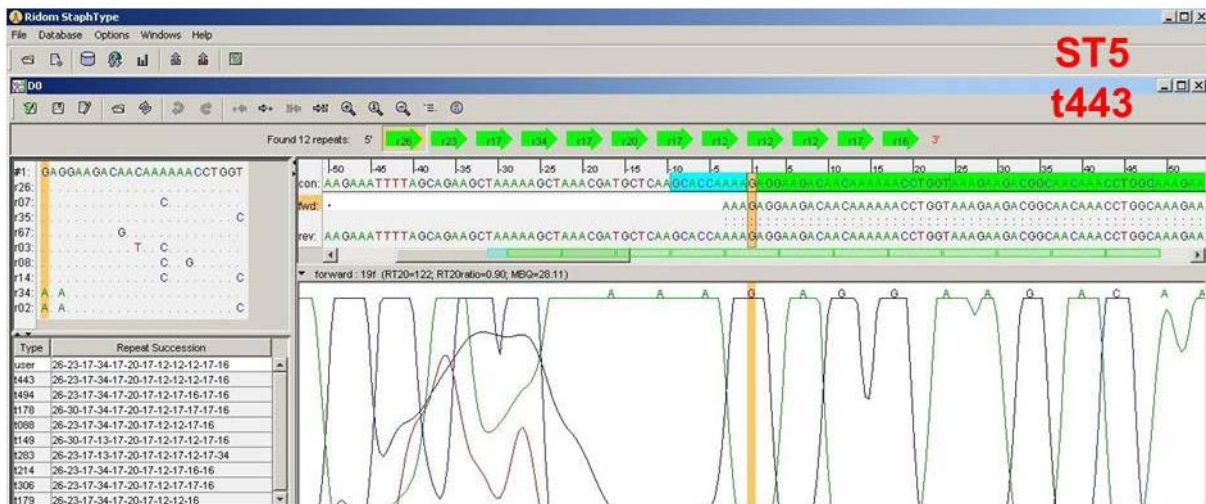


Abbildung 15: spa-Typ t443 mit der Repeat-Abfolge 26-23-17-20-17-12-12-12-17-16

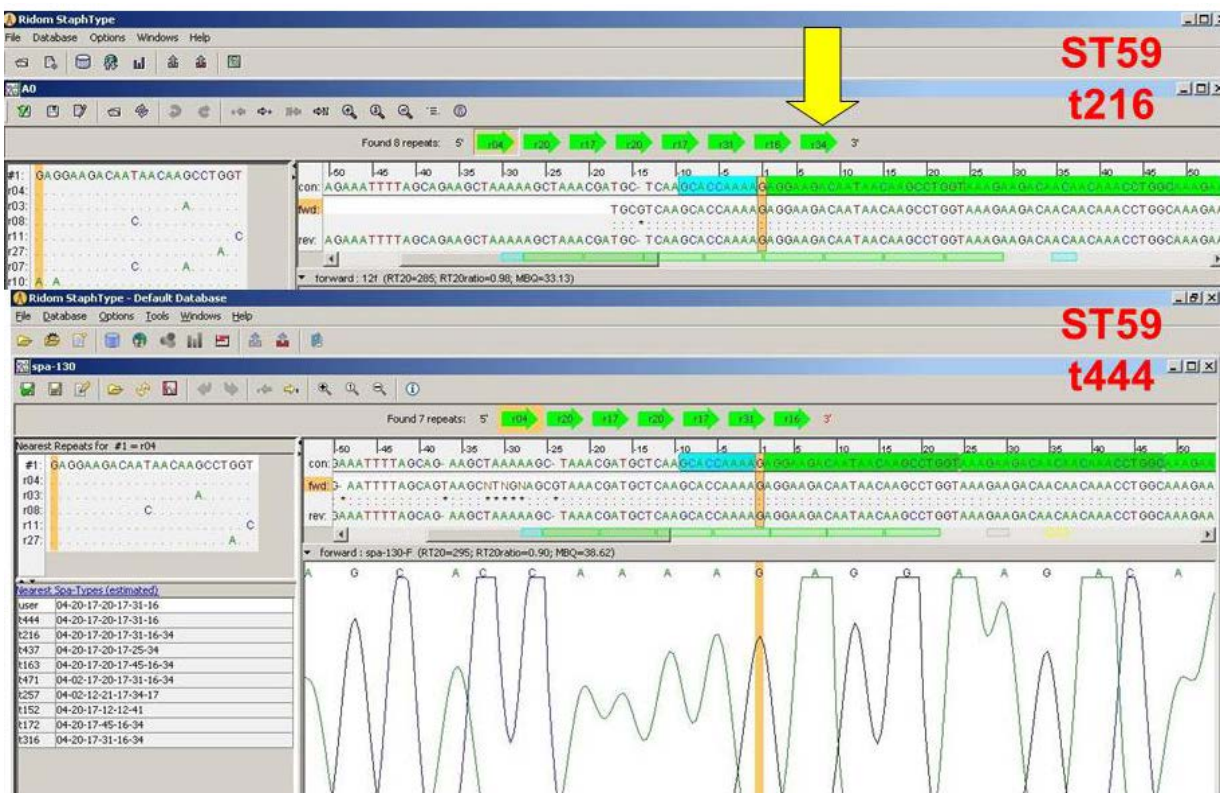


Abbildung 16: spa-Typ t216 mit der Repeat-Abfolge 04-20-17-20-17-31-16-34 und spa-Typ t444 mit der Repeat-Abfolge 04-20-17-20-17-31-16. Der gelbe Pfeil in t216 signalisiert eine Addition in der Repeat-Abfolge im Vergleich zu t444.

3.8.2 spa-Typisierung der MSSA-Isolate

Folgende in Tabelle 18 dargestellten *spa*-Typen konnten über die StaphRIDOM-Software (StaphType) bei den Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Isolaten identifiziert werden. Es zeigte sich eine hochsignifikante Abhängigkeit zwischen *spa*-Typ und ST-Gruppe der MSSA-Isolate ($p < 0,001$).

Tabelle 18: Zuordnung der MSSA-Sequenztypen zu den ermittelten *spa*-Typen

MLST	Anzahl	<i>spa</i> -Typ									
		t004	t008	t045	t127	t148	t175	t189	t211	t216	t940
ST1	7				5		2				
ST5	1			1							
ST8	4		3						1		
ST45	1	1									
ST59	1									1	
ST72	1					1					
ST188	1							1			
kein ST	2										2
Gesamtzahl	18	1	3	1	5	1	2	1	1	1	2

Für den *spa*-Typ t940 konnte kein Sequenztyp ermittelt werden. Die Abbildungen zeigen die *spa*-Typen t045 (Abbildung 17), t127 (Abbildung 18) und t189 (Abbildung 19).

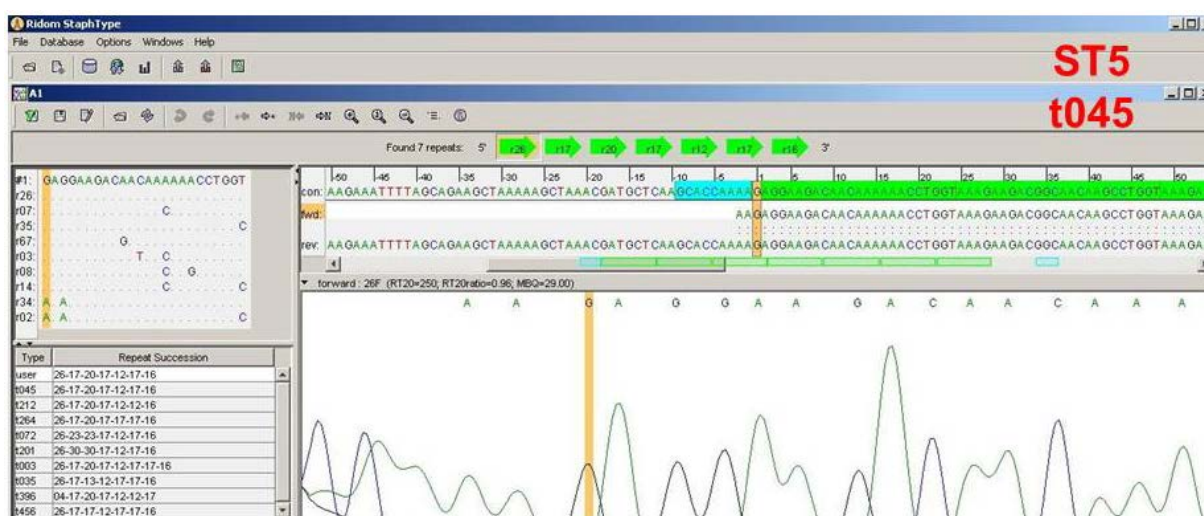


Abbildung 17: *spa*-Typ t045 mit der Repeat-Abfolge 26-17-20-17-12-17-16

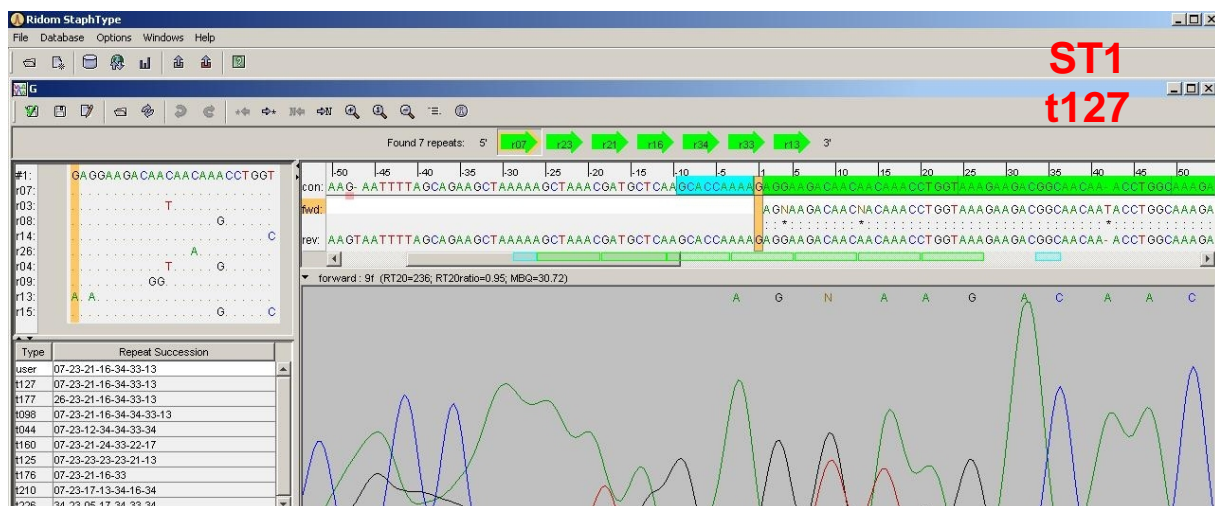


Abbildung 18: spa-Typ t127 mit der Repeat-Abfolge 07-23-21-16-34-33-13



Abbildung 19: spa-Typ t189 mit der Repeat-Abfolge 07-23-12-21-17-34

3.9 Analyse des SCCmec-Typs für die MRSA-Isolate

Die Methicillin-Resistenz von *S. aureus* beruht auf dem Vorhandensein eines bestimmten Genabschnittes namens *mecA*, welches sich eingebettet in dem SCCmec-Genelement befindet [Katayama *et al.*, 2000]. Es existieren aktuell elf verschiedene Haupt-Kassettentypen von SCCmec (Typen I bis XI) [IWG-SCC, 2010]. Die Feststellung dieser Typen wurde durch eine SCCmec-Multiplex-PCR ermöglicht, die für die Typen spezifische Loci auf- (*upstream*) und abwärts (*downstream*) von *mecA* detektiert. Die jeweiligen Typen nehmen vermutlich Einfluss auf die MRSA-Isolate-Verteilung, zudem lassen sich Rückschlüsse auf den genetischen Hintergrund ziehen.

Insgesamt waren unter den Isolaten nur die *SCCmec*-Typen I und IV zu finden (Abbildung 20). Kassettyp I war mit 52 von 101 MRSA-Isolaten (51,49 %) am meisten vertreten, gefolgt von Typ IV mit 48,51 % (49/101).

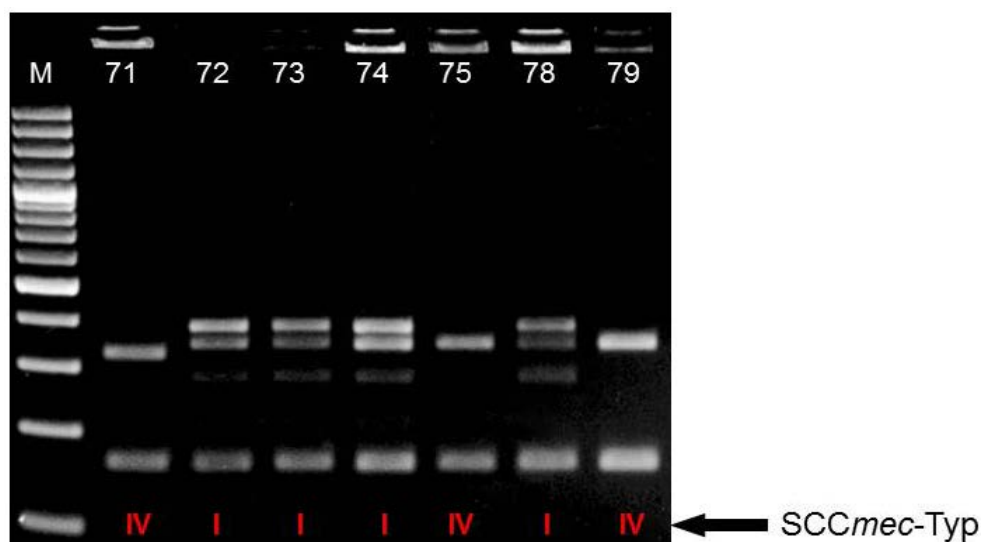


Abbildung 20: Agarose-Gelelektrophorese (1,5%iges Gel); PCR zum Nachweis von *SCCmec* einer Auswahl an *S. aureus*-Isolaten (Proben 71-79; M = Marker). Hier nachgewiesen: *SCCmec*-Typ I und IV.

Ordnet man den *SCCmec*-Typen die MRSA-Resistenzphänotypen zu, lässt sich zusammenfassen, dass das am häufigsten auftretende Muster PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB ($n = 26$) im Gesamten dem *SCCmec*-Typ I, der zweithäufigste Resistenzphänotyp PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV ($n = 17$) komplett dem *SCCmec*-Typ IV zugewiesen werden konnte. Tabelle 19 weist den Resistenzphänotypen die jeweiligen *SCCmec*- und *agr*-Gruppen zu.

Weiterhin konnte die Aussage getroffen werden, dass alle ST5-MRSA-Isolate den *SCCmec*-Typ I trugen. In den 36 ST8-Isolaten wurde *SCCmec*-Typ IV ($36/39 = 92,31\%$) nachgewiesen (ST8-MRSA-IV) und in drei ST8-Isolaten der *SCCmec*-Typ I. Alle 27 ST45-MRSA-Isolate trugen den *SCCmec*-Typ I (ST45-MRSA-I), ebenso 75 % der ST59-Isolate. ST72 ließ sich zu 60 % auf *SCCmec*-Typ IV und 40 % auf Typ I aufteilen.

Tabelle 19: Zuordnung der MRSA-Resistenzphänotypen zu SCC mec und agr

Resistenzphänotyp	Anzahl	Anteil (%)	SCC mec -Typ		agr-Gruppe	
			I	IV	I	III
PEN-OXA-TET	4	3,96	4		4	
PEN-OXA-TET-FUS	11	10,89	4	7	11	
PEN-OXA-TET-ERY	2	1,98	2		2	
PEN-OXA-FUS-LEV	1	0,99		1	1	
PEN-OXA-TET-ERY-FUS	2	1,98		2	2	
PEN-OXA-MOX-FUS-LEV	3	2,97		3	3	
PEN-OXA-SXT-FUS-LEV	1	0,99		1	1	
PEN-OXA-TET-FUS-GEN-TOB	3	2,97		3	3	
PEN-OXA-ERY-CLI-LEV-TOB	4	3,96	4		4	
PEN-OXA-ERY-CLI-FUS-LEV	2	1,98		2	2	
PEN-OXA-ERY-MOX-FUS-LEV	1	0,99		1	1	
PEN-OXA-MOX-FUS-LEV	2	1,98		2	2	
PEN-OXA-SXT-MOX-FUS-LEV	1	0,99		1	1	
PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB	26	25,74	26		14	12
PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV	17	16,83		17	17	
PEN-OXA-ERY-CLI-FUS-LEV-TOB	1	0,99	1		1	
PEN-OXA-SXT-ERY-CLI-FUS-LEV	1	0,99		1	1	
PEN-OXA-SXT-ERY-CLI-LEV-TOB	3	2,97	3		3	
PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV-TOB	9	8,91	7	2	9	
PEN-OXA-TET-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV	1	0,99		1	1	
PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-GEN-LEV-TOB	2	1,98	1	1	2	
PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-GEN-FUS-LEV-TOB	2	1,98		2	2	
PEN-OXA-SXT-ERY-CLI-FUS-LEV-TOB	2	1,98		2	2	
Gesamtzahl	101	100,00	52	49	89	12

PEN = Penicillin; OXA = Oxacillin; SXT = Trimethoprim/Sulfamethoxazol; TET = Tetracyclin; ERY = Erythromycin; CLI = Clindamycin; MOX = Moxifloxacin; GEN = Gentamicin; FUS = Fusidinsäure; LEV = Levofloxacin; TOB = Tobramycin

Für die statistische Analyse wurden in Tabelle 20 erneut die wichtigsten Resistenzphänotypen in Gruppen eingeteilt.

Es wurden für die verschiedenen Resistenzphänotyp-Gruppen jeweils getrennt die Aufteilung der SCC mec -Typen bzw. analog der agr-Gruppen zwischen Resistenzphänotyp-angehörigen und –nichtangehörigen MRSA-Isolaten verglichen (Chi-Quadrat-Test).

Sowohl für die *SCCmec*-Typen als auch für die *agr*-Gruppe ergaben sich signifikante Abhängigkeiten mit PEN-OXA-ERY-CLI* und PEN-OXA-TOB*.

Tabelle 20: Abhängigkeiten zwischen Resistenzphänotyp-Gruppen und *SCCmec*-Typ oder *agr*-Gruppe der MRSA-Isolate. Berechnet wurden die p-Werte mit dem Chi-Quadrat-Test.

Resistenzphänotyp-Gruppen	<i>SCCmec</i> -Typ		p-Wert ^a	<i>agr</i> -Gruppe		p-Wert ^b
	I	IV		I	III	
PEN-OXA-TET* (n = 23)	10	13	0,478	23		0,063
PEN-OXA-ERY-CLI* (n = 70)	42	28	0,017	58	12	0,016
PEN-OXA-SXT* (n = 8)	3	5	0,479	8		0,591
PEN-OXA-GEN* (n = 7)	1	6	0,055	7		0,595
PEN-OXA-TOB* (n = 52)	42	10	< 0,001	40	12	< 0,001
Gesamtzahl Isolate (n = 101)	52	49		89	12	

a: Abhängigkeit Resistenzphänotyp – *SCCmec*

b: Abhängigkeit Resistenzphänotyp – *agr*

Ebenfalls zeigten sich bei den MRSA-Isolaten signifikante Abhängigkeiten zwischen *SCCmec*-Typen und *agr*-Gruppen ($p < 0,001$), welche in Tabelle 21 dargestellt wurden. Der *SCCmec*-Typ IV war nur bei *agr*-Gruppe I vertreten.

Tabelle 21: Abhängigkeiten zwischen *SCCmec*-Typ und *agr*-Gruppe der MRSA-Isolate. Berechnet wurden die p-Werte mit dem Chi-Quadrat-Test.

	<i>agr</i> -Gruppe I	<i>agr</i> -Gruppe III	p-Wert
<i>SCCmec</i>-Typ I (n = 52)	40	12	< 0,001
<i>SCCmec</i>-Typ IV (n = 49)	49	0	< 0,001
Gesamtzahl Isolate (n = 101)	89	12	

Bei einer Zuordnung von *SCCmec*-Typ zu den exprimierten Toxigenen der MRSA-Isolate (Tabelle 22) fiel auf, dass das Gen *sea* nur bei Isolaten vom *SCCmec*-Typ IV, das Gen *hlgB* dagegen nur bei solchen vom *SCCmec*-Typ I auftrat und exprimiert wurde. Eine signifikante Abhängigkeit zu *SCCmec*-Typ wiesen neben *sea* ($p < 0,001$) und *hlgB* ($p < 0,001$) auch *sec* ($p = 0,021$), *seg* ($p = 0,008$), *sei* ($p = 0,005$), *lukE* ($p < 0,001$) und *lukPV* ($p < 0,001$) auf.

Tabelle 22: Zuordnung der Toxingenexpression zu den nachgewiesenen SCCmec-Typen und deren Abhängigkeiten. Berechnet wurden die p-Werte im Chi-Quadrat-Test.

Toxingen	Anzahl	SCCmec-Typ		p-Wert
		I	IV	
<i>sea</i>	29		29	< 0,001
<i>seb</i>	2	1	1	1,000
<i>sec</i>	14	3	11	0,021
<i>see</i>	1		1	0,485
<i>seg</i>	22	17	5	0,008
<i>seh</i>	3	3		0,243
<i>sei</i>	56	36	20	0,005
<i>tst</i>	14	6	8	0,571
<i>hlgA</i>	70	37	33	0,829
<i>hlgB</i>	23	23		< 0,001
<i>lukE</i>	68	20	48	< 0,001
<i>luk-PV</i>	69	25	44	< 0,001
Gesamtzahl Isolate (n = 101)		52	49	

3.10 Phylogenetische Analyse und Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den einzelnen MSSA- und MRSA-Isolaten

Um phylogenetische Analysen durchzuführen, wurde ein Dendrogramm erstellt (Abbildung 21). Null stellt dabei als genetischer Abstand die identischen Sequenztypen dar (STs). Die STs, die sich verwandtschaftlich am nächsten sind, sind durch eine vertikale Linie verbunden und bilden einen *Cluster* (Gruppierung). Sie gehen jeweils von einem Knoten aus, welcher wiederum den Vorfahren vertritt, von dem aus diese gemeinsamen Verwandten hervorgegangen sind. Jeder neue *Cluster* wird nach dem nächsten Paar durchsucht und so weiter. Jeder Endzweig/-ast bzw. jedes Blatt des Dendrogramms repräsentiert einen Sequenztyp. Die Ast-Länge verhält sich meist proportional zu der geschätzten Zeit, in der sich die Arten separiert haben oder der Anzahl der Mutationen [Academic dictionaries and encyclopedias]. Der Abstand zwischen zwei *Clustern* entspricht dem Mittelwert der paarweisen Abstände aller Sequenzen in beiden *Clustern* (siehe Kapitel 2.7.1.1).

Die verschiedenen STs aus Panama lassen sich in zwei *Cluster* unterteilen. Im Stammbaum zählen zum *Cluster I* ST5, ST1 und ST188 und zum *Cluster II* ST8, ST45 und ST59, wobei zu erkennen ist, dass sowohl ST1 und ST188 als auch ST45 und ST59 enger verwandt sind.

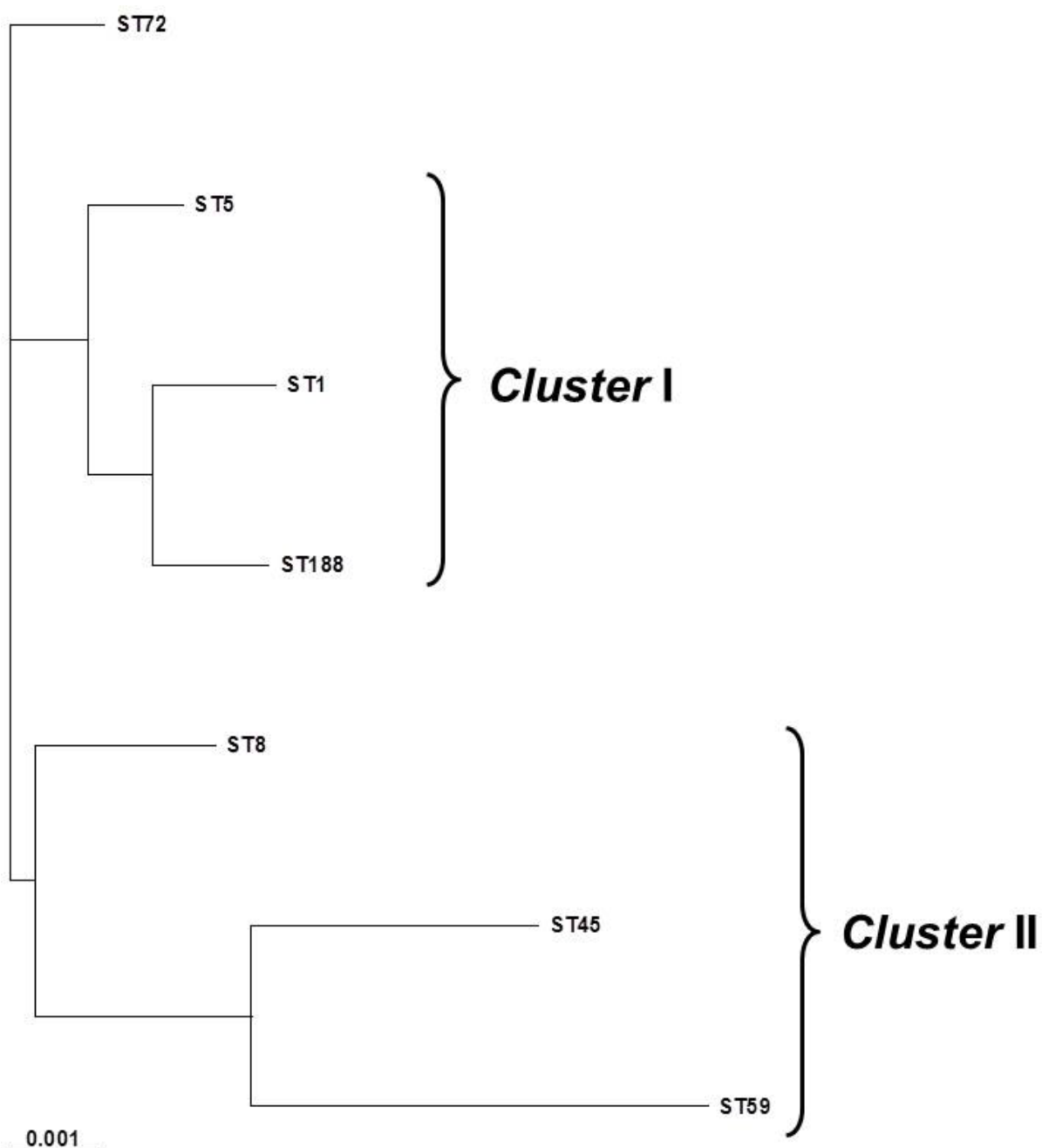


Abbildung 21: Dendrogramm, erstellt mit dem TreeView Software Programm. Dargestellt wird die phylogenetische Verwandtschaft bzw. die klonalen Beziehungen der detektierten MSSA- und MRSA-Isolate aus Panama (ST72, *Cluster I* (ST1, ST5, ST188), *Cluster II* (ST8, ST45, ST59)).

4. Diskussion

4.1 Antibiotika-Resistenz von *Staphylococcus aureus* in Panama

In der vorliegenden Arbeit betrug die MRSA-Rate 84,9 %. Dieser Anteil bezieht sich auf die Studienpopulation, bei der überwiegend MRSA-Isolate selektiert wurden. Die tatsächliche gesamte MRSA-Rate Panamas kann aus diesen Isolaten schlecht ermittelt werden. Ausgehend allerdings von der festgestellten MRSA-Rate ist diese im Vergleich zu denen anderer Staaten als dramatisch anzusehen. So fanden sich in den USA zwar ebenfalls hohe MRSA-Raten, dennoch lagen diese immer noch unter derjenigen aus Panama. Im Jahr 2003 lag die MRSA-Rate der Vereinigten Staaten bei 64,4 % [Klevens *et al.*, 2006]. Auch Länder mit geographischer Nähe zu Panama wiesen recht hohe MRSA-Raten auf. Reyes *et al.* konnten im Nachbarstaat Kolumbien eine MRSA-Prävalenz von 45 % nachweisen. Noch weitere innerhalb der Studie untersuchte Länder, die sich in der Nähe zu Panama befanden, waren Ecuador mit einer Rate von 28 %, Peru mit 62 % und Venezuela mit 26 % [Reyes *et al.*, 2009]. Als Beispiele für niedrige MRSA-Raten lassen sich europäische Länder sehr gut anführen. Die Resistenzstudie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft fasst im Abstand einiger Jahre den MRSA-Anteil bei *S. aureus*-Infektionen der Länder Deutschland, der Schweiz und Österreich zusammen. Im Rahmen dieser Studie veröffentlichten Kresken *et al.* 2010 eine MRSA-Rate von 16,7 % (zuvor lag diese im Jahr 2007 noch bei 20,3 %) [Kresken *et al.*, 2010].

Auch für einzelne andere Antibiotika konnten unter den *S. aureus*-Isolaten (MSSA und MRSA zusammen) aus Panama jeweils höhere Resistenzraten festgestellt werden. Verglichen wurden die Daten mit der PEG-Resistenzstudie 2010: Bei den *S. aureus*-Isolaten aus Panama war die Resistenzrate gegenüber Erythromycin etwa 67 % (vgl. PEG 22,40 %), gegenüber Clindamycin etwa 59,7 % (vgl. PEG 12 %), gegenüber Levofloxacin etwa 68 % (vgl. PEG 22,70 %), sowie gegen Moxifloxacin etwa 54,6 % (vgl. PEG 21,8 %) bzw. Gentamicin etwa 5,9 % (vgl. PEG 3,2 %) auf [Kresken *et al.*, 2010].

Die MSSA-Isolate alleine betrachtet zeigten ihre größte Resistenz gegenüber Penicillin mit einer Rate von 77,77 %. Im Vergleich zu anderen Staaten waren die MSSA-Isolate aus Panama damit sogar relativ gut empfindlich. So konnte in Peru die Arbeitsgruppe Carmona *et al.* bei den MSSA-Isolaten eine Resistenz von 96,4 % gegenüber Penicillin nachweisen. Ihre Isolate stammten aus Nasenabstrichen [Carmona *et al.*, 2012]. Auch Chen *et al.* detektierten eine höhere Penicillin-Resistenz mit 91 % bei MSSA-Isolaten aus Taiwan [Chen *et al.*, 2012]. Die Arbeitsgruppe Blomfeldt *et al.* konnte im Akershus Universitätsklinikum in

Lørenskog, Norwegen, eine mit 80 % knapp höhere Resistenz gegenüber Penicillin nachweisen; untersucht wurden in ihrer Studie allerdings nur MSSA-Isolate, die bei Patienten mit einer Bakteriämie nachgewiesen wurden [Blomfeldt *et al.*, 2012].

Die MRSA-Keime stellten sich dagegen mit 96,04 % hauptsächlich multiresistent gegenüber verschiedenen Antibiotika dar (\geq vier unterschiedliche Antibiotika-Resistenzen). Der vorherrschende Resistenzphänotyp war PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB mit 25,74 %.

4.2 Analyse der Toxingene

Die pathogenen Eigenschaften der *S. aureus*-Isolate aus Panama beruhten unter anderem auf ihrer Expression der Virulenzdeterminanten, den Toxingenen. Unter den Enterotoxingenen war *sei* unter allen Isolaten Panamas das am häufigsten nachgewiesene mit 52,54 % (MRSA 55,44 %; MSSA 33,33 %). Ebenfalls überdurchschnittlich häufiger detektiert werden konnte *sea* unter den MRSA-Isolaten mit einer Rate von 28,71 %, bei den MSSA-Isolaten sogar mit 33,33 %. Dabei fiel auf, dass *sea* bei den MRSA-Isolaten ausnahmslos bei solchen mit SCC*mec*-Typ IV nachgewiesen wurde. Die vorliegenden Ergebnisse unterscheiden sich von den veröffentlichten Daten von Wang *et al.* Diese Arbeitsgruppe analysierte die Virulenzdeterminanten von 60 *S. aureus*-Isolaten, die im Universitätsklinikum in Tianjin, China bei Bakteriämie-Patienten detektiert wurden. Bei ihnen zeigte sich *sea* bei MRSA mit über 84 % deutlich dominanter, bei MSSA dagegen seltener mit knapp 20 %. *Sei* wurde nicht untersucht [Wang *et al.*, 2013]. Auch Lim *et al.* detektierten *sea* als häufigstes Enterotoxinogen bei MRSA aus Malaysia, hier allerdings mit nur rund 39 %. MSSA-Isolate wurden nicht getestet. *Sei* wurde hier sogar nur mit wenigen 7,45 % nachgewiesen [Lim *et al.*, 2012]. Eine größere Übereinstimmung der Daten ist indes bei der Arbeitsgruppe Kim *et al.* zu finden. Ähnlich der Resultate aus Panama konnte auch bei den aus Korea stammenden MRSA-Isolaten das Enterotoxinogen *sei* mit am häufigsten nachgewiesen werden und auch die Detektionsrate von *sea* lag bei vergleichbaren 30 % [Kim *et al.*, 2011]. Auch Ho *et al.* berichteten in ihrer Studie aus Taiwan, dass die MRSA-Isolate zu 26 % das *sea*-Gen trugen. Allerdings nicht deckungsgleich war die Abhängigkeit von *sea* zu SCC*mec*-Typ III (in Panama SCC*mec*-Typ IV) [Ho *et al.*, 2012].

Für das Gen *tst*, welches für das *Toxic-Shock-Syndrome-Toxin* kodiert, existieren ebenfalls sehr unterschiedliche Vergleichsdaten. In Panama wurde *tst* in 13,86 % der MRSA-Isolate bzw. 27,78 % der MSSA-Isolate nachgewiesen. Kim *et al.* wiesen dagegen eine hohe Rate von knapp 66 % bei MRSA nach, Ho *et al.* wiederum rund 33 %, Lim *et al.* im Gegensatz

dazu nur 0,5 % und Wang *et al.* sogar kein einziges Isolat [Wang *et al.*, 2013]; [Ho *et al.*, 2012]; [Lim *et al.*, 2012]; [Kim *et al.*, 2011].

Als letztes Toxin wird im Folgenden noch *luk-PV* diskutiert. Die Detektionsrate von *luk-PV* lag bei den MRSA-Isolaten aus Panama bei 68,32 %, bei den MSSA-Isolaten konnte das Gen mit 77,78 % nachgewiesen werden. Ein Nachweis des Panton-Valentine-Leukozidin-Gens bei MRSA-Isolaten stellt einen Hinweis auf einen *community-acquired* MRSA-Stamm dar. In Panama wurde *luk-PV* von MRSA-Isolaten mit SCC*mec*-Typ IV (63,77 %) und -Typ I (36,23%) exprimiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich von denen von Wang *et al.*, diese berichteten von einem *luk-PV*-Anteil von ca. 6,7 % nur bei den MSSA-Isolaten [Wang *et al.*, 2013]. Auch in der Arbeit von Ho *et al.* war der Nachweis von *luk-PV* lediglich in rund 10 % der MRSA-Isolate möglich. Diese MRSA-Isolate konnten dem SCC*mec*-Typ IV sowie dem -Typ V zugewiesen werden [Ho *et al.*, 2012]. Geographische, sozioökonomisch-medizinische und landwirtschaftliche Gründe könnten dies erklären.

4.3 *agr*-Gruppenspezifitäten

Der in dieser Arbeit untersuchte Regulatorlocus *agr* (*accessory gene regulator*), der als *Quorum sensing* die Expression von Virulenzfaktoren von *S. aureus* vermindert oder erhöht, bestimmt über die Pathogenität von *S. aureus* [Novick *et al.*, 1993]; [Novick, 2003].

Die MRSA-Isolate aus Panama wurden der *agr*-Gruppe I sowie der *agr*-Gruppe III zugeordnet, wobei die *agr*-Gruppenspezifität I mit etwa 88 % dominierte und *agr* III bei knapp 12 % der MRSA-Isolate nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zu den MRSA-Isolaten konnten die MSSA-Isolate in die *agr*-Gruppen I, III und IV eingeteilt werden, wobei die häufigsten *agr*-Gruppen I und III jeweils bei 44 % der Isolate nachgewiesen wurden und *agr* IV lediglich in 11 % der Isolate.

Campbell *et al.* konnten in ihrer Arbeit 89 % der MRSA-Isolate der *agr*-Gruppe I zuweisen [Campbell *et al.*, 2008]. Die Daten sind mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Einen Unterschied allerdings lieferte die Prozentzahl für die Gruppe *agr* I der MSSA-Isolate mit 67 % (Panama: MSSA rund 44 %, s. o.). Die übrigen *agr*-Gruppen II bis IV wurden in Campbells Studie zusammengefasst in 11 % der MRSA- sowie 33 % der MSSA-Isolate [Campbell *et al.*, 2008]. Die untersuchten Isolate stammten aus den USA und Südafrika, was einen Hinweis auf die Differenz der MSSA-Ergebnisse liefern könnte.

4.4 Zuordnung der MRSA-*agr*-Gruppen zu den Toxingenprofilen

Alle multiresistenten MRSA-Isolate ließen sich *agr* I zuordnen. Das häufigste nachgewiesene Toxingenprofil „*sea, hlgA, lukE, luk-PV*“ konnte zu 100 % zu *agr* I zugeordnet werden, ebenso wie fast alle anderen detektierten Toxingenprofile. Einzig die Toxingenprofile „*seg, sei, hlgA, lukE, luk-PV*“, „*sei, lukE, luk-PV*“ und „*sei, hlgA, lukE, luk-PV*“ ließen sich sowohl von MRSA-Isolaten mit *agr* I als auch *agr* III nachweisen. Nur ein einziges Toxingenprofil konnte ausschließlich *agr* III zugeordnet werden. Es handelt sich dabei um das Profil „*sei, luk-PV*“. Zu beachten sei hierbei, dass dieses nur von einem MRSA-Isolat exprimiert wurde.

Diese recht ungleichmäßige Verteilung von *agr*-Gruppen zu den Toxingenprofilen zugunsten *agr* I könnte dafür sprechen, dass es sich bei den MRSA-Isolaten der *agr*-Gruppe I um eher stärker pathogene Isolate handelt, als solche der Gruppe *agr* III. Dies bestätigt somit weitestgehend auch die Studie von Campbell *et al.* mit ihrer hohen Häufigkeit von *agr* I bei *S. aureus*-Isolaten, die für komplizierte Haut- und Weichteilinfektionen verantwortlich waren [Campbell *et al.*, 2008]. Des Weiteren wäre zu überlegen, ob sich durch die angenommene stärkere Pathogenität auch die Überlebensfähigkeit der MRSA-Isolate steigert und verlängert.

4.5 SCC*mec*-Typen der MRSA-Isolate

Jedes MRSA-Isolat kann in der Regel einem SCC*mec*-Typ zugeteilt werden. Von den aktuell existierenden elf unterschiedlichen Haupt-SCC*mec*-Kassettypen (I bis XI) [IWG-SCC, 2010] konnten in dieser Arbeit nur SCC*mec*-Typ I und SCC*mec*-Typ IV detektiert werden.

Die Nachweisrate unter den MRSA-Keimen aus Panama war recht ausgeglichen. Der Kassettyp I war mit 51,49 % etwas häufiger nachzuweisen als Typ IV mit 48,51 %.

Um die Ergebnisse in Relation zu setzen, werden diese im Folgenden mit Studienresultaten aus Portugal als europäisches Land und Brasilien als Staat Südamerikas verglichen. Espadinha *et al.* analysierten 183 nosokomial-erworbene MRSA-Isolate, die in Portugal im Jahr 2010 gesammelt wurden. SCC*mec*-Typ IV war hierbei der dominierendste Typ mit 76,50 %, gefolgt von Typ II (19,67 %), III (3,28 %) und VI (0,55 %) [Espadinha *et al.*, 2013]. Nicht nachgewiesen wurde SCC*mec* Typ I, wobei dieser unter den MRSA-Isolaten aus Panama sogar am stärksten vertreten war. Ursachen spielten hierbei eventuell Unterschiede bei den zu den Isolaten gehörigen Resistenzphänotypen oder gar bei Behandlungsstrategien der Therapie.

Ein ähnliches Bild zeigte sich in einer Studie aus Brasilien. Rodrigues *et al.* untersuchten 96 MRSA-Isolate – bei einer überwältigenden Mehrheit von 94,79 % der Isolate konnte der SCC*mec*-Typ III nachgewiesen werden. SCC*mec*-Typ IV (4,17 %) und -Typ II (1,04 %) spielten nur eine untergeordnete Rolle [Rodrigues *et al.*, 2013]. Dass in Brasilien der Typ III mit solch hohem Vorkommen auftrat – im Gegensatz zu den Isolaten aus Panama, wo dieser kein einziges Mal detektiert wurde – mag daran liegen, dass es sich bei den Isolaten aus Brasilien um MRSA von Verbrennungsstationen handelte. Diejenigen aus Panama stammten aus unterschiedlichen Abstrichmaterialien von diversen Krankheitserscheinungen.

4.6 Zusammenhang von SCC*mec*-Typ und Antibiotikaresistenz

Die bereits bei *agr* detektierten beiden führenden vorkommenden Resistenzphänotypen bestimmten auch bei der SCC*mec*-Typisierung das Bild. So herrschte bei SCC*mec*-Typ I mit 26 Isolaten und einer Prozentzahl von 25,74 % der Resistenzphänotyp PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB vor (darunter gehörten 14 Isolate *agr* I, 12 *agr* III an). 16,83 % von SCC*mec*-Typ IV besaßen PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV als Resistenzphänotyp (diese konnten alle *agr* I zugewiesen werden).

Die restlichen multiresistenten MRSA-Isolate mit sämtlichen ermittelten Resistenzphänotypen verteilten sich auf beide detektierten SCC*mec*-Typen weitestgehend gleichmäßig ohne wesentliche Ausreißer. Generell lässt sich dadurch annehmen, dass die SCC*mec*-Typen I und IV fast ausschließlich mit einer Multiresistenz korrelieren – zumindest, was die MRSA-Isolate aus Panama betrifft. Es wäre allerdings auch denkbar, dass gerade in Panama zwischen diesen beiden SCC*mec*-Typen ein reger Merkmalsaustausch mittels horizontalem Gentransfer stattfindet, der die eher nur geringen Unterschiede der Typen zueinander in Bezug auf die Multiresistenz erklären könnte [Ito *et al.*, 2001]; [Crisostomo, 2001].

Neben der Multiresistenz ließen sich auch Resistenzen gegenüber nur einzelnen Antibiotika für die beiden SCC*mec*-Typen gegenüberstellen. So fiel auf, dass im Durchschnitt die Isolate des SCC*mec*-Typs IV im Vergleich zu denjenigen des -Typs I häufiger resistent gegen Fusidinsäure und Gentamicin waren. Insgesamt 60 Isolate zeigten eine Resistenz gegen Fusidinsäure, allein 80 % davon wiesen den SCC*mec*-Typ IV auf. Bei Gentamicin lag das Verhältnis bei sechs zu eins Isolaten (Typ IV zu Typ I), aufgrund der allerdings nur geringen Anzahl an nachgewiesenen Resistenzen gegenüber Gentamicin kann dieses Resultat nur mit Vorsicht bewertet werden. Zugunsten von SCC*mec*-Typ I konnte die Resistenzrate gegenüber Tobramycin verzeichnet werden. Zweiundvierzig (80,77 %) der insgesamt

52 detektierten Tobramycin-resistenten MRSA-Isolate gehörten dem SCC*mec*-Typ I an, die restlichen zehn zu -Typ IV.

Die Resultate lassen sich nur sehr bedingt mit denen von Espadinha *et al.* vergleichen. Similarität bestand einzig bei der Resistenzrate von Fusidinsäure beim SCC*mec*-Typ IV. Allerdings fiel diese im Vergleich zu derjenigen in Panama sehr gering aus. Die restlichen Fusidinsäure-Resistenzen der Isolate aus Portugal konnten SCC*mec*-Typ II zugeordnet werden. Bei MRSA-Isolaten mit einer Resistenz gegenüber Gentamicin wurde SCC*mec*-Typ III ermittelt. Eine Resistenz gegenüber Tobramycin wurde in deren Studienmodell nicht untersucht [Espadinha *et al.*, 2013]. Die doch sehr weit auseinanderdriftenden Ergebnisse könnten mit der geographischen Lage, dem unterschiedlichen Patientenklientel und der Verwendung unterschiedlicher Therapieoptionen (u. a. auch mit der Auswahl von unterschiedlichen Antibiotika) zusammenhängen.

4.7 Die Beziehung zwischen SCC*mec*-Typ und *agr*-Gruppe

Sowohl die *agr*-Gruppe (Kapitel 1.4) als auch der SCC*mec*-Typ (Kapitel 1.5.2) tragen zu den Pathogenitätseigenschaften von *S. aureus* bei. Umso interessanter war es daher, festzustellen, ob zwischen den beiden genetischen Determinanten ein signifikanter Zusammenhang existiert. Wie bereits im Kapitel 4.3 erwähnt, stellt die *agr*-Gruppe I unter allen MRSA-Isolaten die größte Gruppe mit 88,12 % dar (89/101). Zwischen SCC*mec*-Typ IV und *agr*-Gruppe I ließ sich eine 100%ige Assoziation herstellen. Der SCC*mec*-Typ I hingegen konnte sowohl *agr* I (zu 77 %) als auch mit 23 % *agr* III zugeordnet werden.

Ob MRSA-Isolate mit der Kombination „SCC*mec*-Typ IV – *agr*-Gruppe I“ pathogener sind als solche mit „SCC*mec*-Typ I – *agr*-Gruppe I bzw. III“, lässt sich nur vermuten und nicht genau eruieren, da *agr* I unter allen untersuchten Isolaten hauptanteilmäßig vertreten war. Allerdings deuten die Resultate darauf hin, dass es sich bei der Kombination „SCC*mec*-Typ IV – *agr*-Gruppe I“ um eine sehr stabile Formation an *S. aureus*-Isolaten handelt. Diese Vermutung wird ebenfalls gestützt durch die von diesen Isolaten exprimierte Toxine. So wurde im Verhältnis unter anderem *tst*, *lukE* und *luk-PV* deutlich häufiger bei den MRSA-Isolaten „SCC*mec*-Typ IV – *agr*-Gruppe I“ detektiert. Die Enterotoxine *sea* und *see* wurden sogar ausschließlich von diesen exprimiert.

4.8 Die Bewertung des Sequenztyps (ST)

Zur Genotypisierung der *S. aureus*-Isolate aus Panama wurde der Sequenztyp mittels MLST bestimmt (siehe Kapitel 1.7.1).

Unter den MSSA-Isolaten aus Panama ($n = 18$) waren die beiden vorherrschenden Sequenztypen ST1 mit 38,89 % und ST8 mit 22,22 %. Weiterhin detektiert wurden mit jeweils 5,56 % die Sequenztypen ST5, ST59, ST72 und ST188. Zwei MSSA-Isolate konnten keinem Sequenztyp zugeordnet werden. Die nachgewiesenen Sequenztypen ließen sich wiederum zu neun *spa*-Typen eingruppierten (*spa*-Typisierung siehe Kapitel 1.7.2). Zu diesen gehörten t004 (ST45), t008 (ST8), t045 (ST5), t127 (ST1), t148 (ST72), t175 (ST1), t189 (ST188), t211 (ST8) und t216 (ST59).

Schuenk *et al.* untersuchten ebenfalls *S. aureus*-Isolate. In ihrer Studie wurden MSSA- und MRSA-Isolate aus einer orthopädischen Klinik in Rio de Janeiro, Brasilien, charakterisiert und MLST zugeordnet [Schuenck *et al.*, 2012]. Ähnlich wie in Panama wurden bei ihren MSSA-Isolaten sowohl ST1 als auch ST5 nachgewiesen, allerdings dominierte hier im Vergleich mit rund 42 % ST5. Zusätzlich detektierten sie noch ST30, den „*Ocean Southwest Pacific Clone*“ [Schuenck *et al.*, 2012].

Auch die Arbeitsgruppe um Marimón *et al.* analysierte MSSA-Isolate, welche aus Nordspanien stammten, und wies ST8 als den am häufigsten vorkommenden Typen nach. ST1 wurde ebenfalls detektiert, des Weiteren konnten sie noch ST10 und ST121 identifizieren [Marimón *et al.*, 2012].

Bei den MRSA-Isolaten aus Panama zeigte sich folgendes Bild der Sequenztypverteilung: Es dominierte mit 38,61 % der „USA300“-Stamm ST8, welcher oft mit dem phänotypisch breiten Resistenzprofil PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV vergesellschaftet war. Der „Berliner Stamm“ ST45 folgte mit 25,74 %. Auch dieser wies mit PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB einen breiten Resistenzphänotyp auf. Die übrigen Sequenztypen verteilten sich auf ST72 (19,80 %), den „New York-“/„Japan-Klon“ ST5 (11,88 %) und den „USA1000“-Stamm ST59 (3,96 %). Dabei zeigten die ST5-Isolate ein einheitliches Resistenzprofilmuster mit PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB. Die MRSA-Isolate ließen sich sieben *spa*-Typen zuordnen (t004 (ST45), t008 (ST8), t024 (ST8), t148 (ST72), t216 (ST59), t443 (ST5) und t444 (ST59)).

Verglichen mit den brasilianischen MRSA-Isolaten der Arbeitsgruppe Schuenk *et al.* konnte einzig ST5 als übereinstimmender Sequenztyp benannt werden. Weitere Sequenztypen in der Studie von Schuenk *et al.* waren noch ST1, ST30 und ST239 [Schuenck *et al.*, 2012].

Ebenfalls nur ein übereinstimmender Sequenztyp existierte mit ST8 unter den MRSA-Isolaten aus Nordspanien [Marimón *et al.*, 2012]. Dieser war – wie auch in Panama – der am häufigsten nachgewiesene Sequenztyp, hier sogar mit 75 %.

Vereinzelt konnte auch die Studie von Tokajian *et al.* ST5 und ST8 unter ihren MRSA-Isolaten nachweisen. Diese stammten aus dem Libanon. Überwiegend wurde dort allerdings ST80 detektiert [Tokajian *et al.*, 2010].

Die größte Deckungsgleichheit boten Studiendaten aus den USA. Die Arbeitsgruppe um Chung *et al.* untersuchte an zwei Krankenhäusern in Miami, Florida, die Häufigkeitsverteilung von MLST der detektierten MRSA-Isolate [Chung *et al.*, 2004]. Wie auch in Panama konnte am häufigsten mit 36 % ST8 nachgewiesen werden. Zwar folgte dort mit ST36 (31 %) ein Sequenztyp, der in Panama nicht detektiert wurde, dafür zeigten einige weitere nachgewiesene Sequenztypen wiederum Übereinstimmung: So dokumentierten Chung *et al.* unter anderem ST5 (12,38 %), ST45 und ST72 [Chung *et al.*, 2004]. Boyle-Vavra *et al.* analysierten insgesamt 914 MRSA-Isolate aus den USA und Taiwan und ermittelten 18 unterschiedliche Sequenztypen. Auch in deren Studie wurde ST8 am häufigsten vorgefunden (48,35 %). ST5, ST59 und ST72 konnten ebenfalls nachgewiesen werden [Boyle-Vavra and Daum, 2010]. Eine ähnliche klonale Verteilung der MRSA-Isolate zeigte die Studie von Tenover *et al.*, in der 493 MRSA-Isolate aus den USA untersucht wurden (darunter 299 von Nasenabstrichen und 194 aus Blutkulturen). Unter den Isolaten der Blutkulturen dominierte auch hier ST8, bei den Nasenabstrichen war ST5 der vorherrschende Sequenztyp [Tenover *et al.*, 2012].

In der vorliegenden Arbeit konnte für alle *S. aureus*-Isolate ST8 als der am häufigsten vorkommende Sequenztyp in Panama aufgezeigt werden. Zu 95,35 % konnte dieser dem *spa*-Typ t008 zugeordnet werden. Die meisten der ST8-MRSA-Isolate trugen zu 92,31 % zudem noch den *SCCmec*-Typ IV (die restlichen wurden *SCCmec*-Typ I zugeordnet). Diese Daten stützen größtenteils die Resultate von Tenover *et al.*, Marimón *et al.*, Boyle-Vavra *et al.* und Chung *et al.* [Chung *et al.*, 2004]; [Boyle-Vavra and Daum, 2010]; [Tenover *et al.*, 2012]; [Marimón *et al.*, 2012].

Unterschiede ergaben sich in der Analyse von ST5 und ST45. Während in der vorliegenden Arbeit allen ST5 und ST45 der *SCCmec*-Typ I zugeordnet werden konnte, wiesen Chung *et al.* diesen jeweils *SCCmec*-Typ II bzw. -Typ IV zu [Chung *et al.*, 2004]. Boyle-Vavra *et al.* detektierten für ST5 sogar mit *SCCmec*-Typ II, III, IV und VIII mehrere Typen [Boyle-Vavra and Daum, 2010]. Auch für ST72 herrschten Unterschiede. Im Vergleich zu Panama mit den zwei dafür nachgewiesenen *SCCmec*-Typen I und IV, detektierten Boyle-Vavra *et al.* die

Typen IV und V, Chung *et al.* nur SCC*mec*-Typ IV [Chung *et al.*, 2004]; [Boyle-Vavra and Daum, 2010]. Dies betraf ebenfalls ST59. Die vorliegende Arbeit konnte für ST59 insgesamt nur einmal den SCC*mec*-Typ IV nachweisen, die restlichen dieser Isolate verteilten sich auf -Typ I. Boyle-Vavra *et al.* konnten dagegen den Großteil ihrer ST59-Isolate dem SCC*mec*-Typ IV zuordnen, zusätzlich ließ sich noch -Typ V nachweisen [Boyle-Vavra and Daum, 2010].

Durch den Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denjenigen anderer Arbeitsgruppen, lässt sich einerseits eine geographische Abweichung der Sequenztypen erkennen, andererseits lässt sich bei einigen wenigen STs aber auch spekulieren, ob teilweise eine Tendenz zur intra-/ interkontinentalen Anpassung bzw. Angleichung erkennbar ist (wie z. B. ST5, welcher in fast jeder Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde). Die dargestellten Unterschiede könnten sich unter anderem dadurch bedingen, dass die Isolate wie diejenigen der Arbeitsgruppe Schuenk *et al.* aus Brasilien nur von orthopädischen Patienten stammten. Eine andere mögliche Begründung für die bestehenden Differenzen ist die landestypische Auswahl an Antiinfektiva. So führt das Verwenden unterschiedlicher Antibiotika zur Selektion spezifischer Isolate, die spezielle Resistenzen besitzen.

Bei der Betrachtung der Sequenztypen und SCC*mec* fiel auf, dass kein signifikanter Zusammenhang besteht. Eine geographische Divergenz lässt sich auch hier ausmachen. Dadurch verstärkt sich der Verdacht, dass eine unterschiedliche Zusammensetzung von ST und SCC*mec*-Typ durch einen grundsätzlich eher einfachen SCC*mec*-Gentransfer bedingt ist. Die SCC*mec*-Genelemente können aus anderen *S. aureus*-Isolaten stammen oder vorherige SCC*mec* einfach verdrängen. Das kann von Land zu Land oder Krankenhaus zu Krankenhaus sehr unterschiedlich ausfallen.

Des Weiteren ist durch den Vergleich der Resultate Panamas (sowohl ST als auch SCC*mec*) tendenziell eine größere Ähnlichkeit zu denjenigen aus den USA erkennbar. Es kann also davon ausgegangen werden, dass eventuell das Gesundheitssystem Panamas und die Reise- bzw. Aufenthaltsrouten der Einwohner Panamas eher nördlich in Richtung der Vereinigten Staaten orientiert ist. Der bei den MRSA-Isolaten vorherrschende Resistenzphänotyp war PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB und konnte SCC*mec*-Typ I zugewiesen werden. Mit Hilfe der *spa*-Typisierung ließen sich die MRSA-Stämme noch feiner differenzieren.

4.9 Die Verwandtschaftsbeziehungen der *S. aureus*-Isolate Panamas

In Kapitel 3.10 wurde bereits dargelegt, dass unter den Sequenztypen der *S. aureus*-Isolate Panamas zwei Haupt-*Cluster* charakterisiert werden konnten. ST1, ST5 und ST188 gehörten dabei dem *Cluster* I an, dem *Cluster* II wurden ST8, ST45 und ST59 zugeordnet (Abbildung 21). Hervorzuheben ist, dass innerhalb der *Cluster* ST1 und ST188 sehr eng verwandt sind, ebenso wie ST45 und ST59.

Zu betonen sei dabei, dass es sich bei ST1 und ST188 ausnahmslos um MSSA-Isolate handelte. Bei den Sequenztypen ST45 und ST59 ließ sich jeweils ein Isolat zu MSSA zuordnen, die restlichen Isolate mit diesen Sequenztypen waren Methicillin-resistent. Diese wiederum stimmten größtenteils hinsichtlich ihres *SCCmec*-Typs, dem -Typ I, überein.

Wie bereits erörtert, ist laut den Untersuchungen dieser Arbeit der Sequenztyp ST8 der vorherrschende im Universitätsklinikum Hospital Santo Tomás in Panama City des Landes Panama. Die anderen wenigen nachgewiesenen Sequenztypen waren dort zusätzlich noch im Umlauf, jedoch sind diese relativ eng miteinander verwandt, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass sich diese Isolate einer sehr guten Anpassung an die in Panama vorherrschenden Bedingungen unterzogen haben.

4.10 Ausblick

Ein essentielles Ziel bei Infektionen mit *S. aureus*, insbesondere MRSA, ist die erfolgreiche Therapie und somit Eindämmung weiterer Ausbreitung innerhalb eines Landes, eines Kontinents und letztlich der Welt. Trotz der ausgedehnten Resistenzlage der MRSA-Isolate aus Panama bestünde die Möglichkeit, dadurch ausgelöste Infektionen dennoch Antibiotogramm-gerecht zu behandeln. In dieser Arbeit existierten gegenüber Fosfomycin, Linezolid und Rifampicin keine Resistenzen und auch gegenüber Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Gentamicin zeigten sich die MRSA-Isolate zu einem sehr großen Teil sensibel. Alle *S. aureus*-Isolate waren empfindlich gegenüber Glykopeptiden. Um allerdings zukünftig neue Resistenzen zu vermeiden, müssen zwei mechanistisch verschieden wirksame Antibiotika miteinander kombiniert werden [Liu *et al.*, 2011]. So sollten bei der Verdachtsdiagnose einer schweren MRSA-Infektion oder dem direkten MRSA-Keimnachweis z. B. Vancomycin und Rifampicin kombiniert werden. Als Anwendungsgebiet von Linezolid gelten Sepsis, septischer Schock und eine hohe MRSA-Rate bei Pneumonie. Daher zählen unter anderem sowohl Vancomycin als auch Linezolid zu den Reserveantibiotika [Micek, 2007]; [Liu *et al.*, 2011]. Hinzu kommt noch ein weiterer schwieriger Aspekt – Linezolid als Beispiel ist sehr teuer. Gerade in den Entwicklungsländern führt dies zu Problemen in der Versorgung.

Es lässt sich trotz der durchgeführten Datenerhebung in dieser Dissertation über die Entwicklung der Infektionsrate in den vergangenen Jahren keine Aussage treffen, da zuvor in Panama noch keine großen Untersuchungen zur MRSA- bzw. MSSA-Verteilung stattfanden. Es wäre daher als sinnvoll zu erachten, auch in Zukunft weitere Daten über Infektionen mit *S. aureus* in Panama zu erfassen, um Resistenzabweichungen oder gar neue Resistenzentstehungen zu analysieren sowie zu dokumentieren. Des Weiteren könnten Schlüsse bzw. Zusammenhänge zwischen Infektionen und bestimmten Sequenztypen gezogen und dadurch zudem festgestellt werden, ob bestimmte Sequenztypen sogar andere verdrängen, wie es sich in Deutschland in den letzten drei Dekaden abgezeichnet hat. So konnte in Deutschland ein deutlicher Rückgang der noch Mitte der 1990er Jahre häufig auftretenden Epidemiestämme „Norddeutscher“ (ST 247) und „Süddeutscher“ (ST 228) Epidemiestamm beobachtet werden (von 17 % bzw. 34 % im Jahr 1996 auf 0 % bzw. 2,5 % im Jahr 2011). Die „älteren“ Epidemiestämme wurden mehr und mehr von den „neueren“ verdrängt. Zu diesen zählen u. a. der „Barnimer“ (ST 22) oder auch der „Berliner“ (ST 45) Epidemiestamm. Dort kam es beim „Barnimer“ Epidemiestamm um eine Zunahme von 8 % (1997) auf 51 % (2011), beim „Berliner“ Epidemiestamm von 22 % (1996) auf 30 % (2010) [Robert Koch-Institut, 2003]; [Layer *et al.*, 2012].

Ebenfalls wäre es von großer Bedeutung, zu untersuchen, ob im Rahmen von Kolonisation bzw. Infektion Zusammenhänge oder Unterschiede hinsichtlich der Erkrankungsart, den gesundheitlichen Risikofaktoren, der geographischen Lage (Stadt vs. Land), den sozioökonomischen Faktoren, etc. existieren. Solche Daten könnten sehr hilfreiche Informationen anbieten, um empirische Therapieempfehlungen zu etablieren bzw. prophylaktisch vor Ausbruchssituationen zeitnah und zielgerecht zu handeln. Um eine nosokomiale MRSA-Kolonisation von den übrigen MRSA-Besiedlungen zu unterscheiden, wäre ein angemessenes Screening-Programm bedeutsam. Hiermit könnte man gegebenenfalls *community-acquired* MRSA (CA-MRSA) bzw. *livestock-associated* MRSA (LA-MRSA) detektieren, d. h. nach einer weiteren genetischen Charakterisierung dieser Isolate. Eine weitere Studie wäre vonnöten, um invasive MRSA-Infektionen zu analysieren und den invasiven MSSA-Infektionen gegenüberzustellen. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, das Verschreibungsverhalten der Kliniken bzw. Ärzte zu beobachten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern ebenso einen Bedarf für intensivere Analysen von bestimmten Patientengruppen. Fokussiert an schwerwiegenden Erkrankungen z. B. aus dem hämatologisch-onkologischen Bereich oder der Intensivmedizin, könnten mit Hilfe von gezielt gewonnenen Patientenmaterialien (wie postoperativ gesammelte Sekrete) präventive Maßnahmen entwickelt werden.

Die oben genannten weiterführenden Fragestellungen könnten die Thematik der *S. aureus*-Infektionen in Panama weiter beleuchten, sodass mit Hilfe dieser unter anderem ein besserer und qualitativ höherwertiger Vergleich zu Nachbarstaaten getätigt werden kann. Es könnten erfolgreichere und sichere Therapieregime entwickelt werden, um die Ausbreitung von MRSA-Infektionen sowie -Kolonisation einzudämmen. Diese könnten gegebenenfalls an die verschiedenen Regionen (innerhalb einer Klinik, auf Landesebene, etc.) angepasst werden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Epidemiologie von *S. aureus* in Panama. Wissenschaftlicher Gegenstand der Arbeit war es, die Methicillin-resistenten und -sensiblen *S. aureus*-Isolate phäno- sowie genotypisch zu charakterisieren und deren Toxingene molekularbiologisch zu analysieren. Bisher gibt es noch keine Arbeiten, die die Populationsgenetik und phylogenetischen Eigenschaften von *S. aureus* in Panama beschreiben.

Die 119 *S. aureus*-Isolate des Universitätsklinikums in Panama, die in den Jahren 2008 bis 2010 aus unterschiedlichen klinischen Abstrichmaterialien, Blutproben, Punktaten und Gewebeproben gewonnen wurden, waren zu 84,9 % MRSA- und 15,1 % MSSA-Isolate. Unter den 101 MRSA-Isolaten wurden fünf Sequenztypen detektiert (ST5, ST8, ST45, ST59 und ST72). Darunter stellten ST8-MRSA-IV ($n = 36$) und ST45-MRSA-I ($n = 26$) die häufigsten Stämme dar. Alle Sequenztypen bis auf ST5 konnten der *agr*-Gruppe I zugeordnet werden, ST5 gehörte der *agr*-Gruppe III an. Bei der MRSA-Population aus Panama konnten sieben *spa*-Typen ermittelt werden (t004, t008, t024, t148, t216, t443 und t444). Unter den MRSA-Isolaten war der vorherrschende Resistenzphänotyp PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-LEV-TOB mit knapp 25 % vertreten, gefolgt vom Resistenzphänotypen PEN-OXA-ERY-CLI-MOX-FUS-LEV (~ 17 %); dieser wurde nur bei MRSA-Isolaten mit dem Sequenztyp ST8 nachgewiesen. Das häufigste Toxingenprofil „*sea, hlgA, lukE, luk-PV*“ konnte insgesamt bei 15 Isolaten detektiert werden.

Bei den MRSA-Stämmen aus Panama konnte zusätzlich noch ein signifikanter Zusammenhang von *agr*-Gruppenspezifität und SCC*mec*-Typ beobachtet werden.

Während die vorhandenen Sequenztypen der MRSA-Isolate aus Panama eine relativ eingeschränkte Diversität zeigten (es zirkulierten hier hauptsächlich die zwei klonalen Linien ST8 und ST45), stellten sich die 18 MSSA-Isolate heterogener dar. Ihnen konnten insgesamt sieben Sequenztypen zugeordnet werden (ST1, ST5, ST8, ST45, ST59, ST72, ST188). Eine kaum nennenswerte klonale Häufung war für ST1 ($n = 7$) zu finden, dieser Stamm wurde der *agr*-Gruppe III zugeordnet, die anderen Stämme verteilten sich auf *agr* I und *agr* IV. Auch bei den MSSA-Isolaten fand eine Feintypisierung mit *spa* statt, es konnten neun *spa*-Typen detektiert werden: t004, t008, t045, t127, t148, t175, t189, t211 und t216. Der häufigste Resistenzphänotyp, der zumeist bei ST1-Stämmen nachgewiesen wurde, war PEN-FUS mit knapp 39 %. Eine Penicillinresistenz konnten fast 78 % der MSSA-Isolate aufweisen. Das vorherrschende Toxingenprofil war „*sea, seh, hlgA, lukE, luk-PV*“ (~ 17 %).

6. Literaturverzeichnis

1. **Academic dictionaries and encyclopedias.** *Phylogenetischer Baum*. URL: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1106627> (Stand: 11 Jan. 2013).
2. **Becker, H., C. Bürk and E. Märtlbauer.** 2007. Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis. *J. Verbr. Lebensm.* **2** (2): 171–189.
3. **Becker, K., A. W. Friedrich, G. Lubritz, M. Weilert, G. Peters and C. v. Eiff.** 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41** (4): 1434–1439.
4. **Becker, K., R. Roth and G. Peters.** 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J. Clin. Microbiol.* **36** (9): 2548–2553.
5. **Bergdoll, M. S.** 1989. *Staphylococcus aureus*. In M. P. Doyle (ed), Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc, New York and Basel.
6. **bioMérieux.** *VitekCard_redim_thumb17.jpg (JPEG-Grafik, 270 x 215 Pixel)*. URL: http://www.biomerieux.de/upload/VitekCard_redim_thumb17.jpg (Stand: 13 Mar. 2013).
7. **Blomfeldt, A., H. V. Aamot, A. N. Eskesen, F. Muller and S. Monecke.** 2012. Molecular Characterization of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates from Bacteremic Patients in a Norwegian University Hospital. *Journal of Clinical Microbiology.* **51** (1): 345–347.
8. **Boucher, H. W. and G. R. Corey.** 2008. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* **46** (S5): S344.
9. **Boyle-Vavra, S. and R. S. Daum.** 2010. Reliability of the BD GeneOhm Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Assay in Detecting MRSA Isolates with a Variety of Genotypes from the United States and Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology.* **48** (12): 4546–4551.
10. **Bronner, S., P. Stoessel, A. Gravet, H. Monteil and G. Prévost.** 2000. Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (9): 3931–3938.
11. **Campbell, S. J., H. S. Deshmukh and C. L. Nelson, et al.** 2008. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. *Journal of Clinical Microbiology.* **46** (2): 678–684.
12. **Carmona, E., S. Sandoval and C. García.** 2012. Frecuencia y susceptibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus* proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* **29** (2): 206–211.

13. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 1999. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **48** (32): 707–710.
14. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51** (26): 565–567.
15. **Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10** (4): 781–791.
16. **Chen, F.-J., L.-K. K. Siu, J.-C. Lin, C.-H. Wang and P.-L. Lu.** 2012. Molecular typing and characterization of nasal carriage and community-onset infection methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates in two Taiwan medical centers. *BMC Infect. Dis.* **12** (1): 343.
17. **Chung, M., G. Dickinson, H. d. Lencastre and A. Tomasz.** 2004. International Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Two Hospitals in Miami, Florida. *Journal of Clinical Microbiology.* **42** (2): 542–547.
18. **Cooper, J. E. and E. J. Feil.** 2004. Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends Microbiol.* **12** (8): 373–377.
19. **Crisostomo, M. I.** 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **98** (17): 9865–9870.
20. **Diep, B. A. and M. Otto.** 2008. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol.* **16** (8): 361–369.
21. **Diep, B. A., G. F. Sensabaugh, N. Somboonna, N. S. Somboona, H. A. Carleton and F. Perdreau-Remington.** 2004. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. *J. Clin. Microbiol.* **42** (5): 2080–2084.
22. **Dinges, M. M., P. M. Orwin and P. M. Schlievert.** 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13** (1): 16-34, table of contents.
23. **DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.** *DSMZ - Bacterial Nomenclature Up-to-Date, Genus: Staphylococcus.* URL: http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Staphylococcus (Stand: 11 Mar. 2013).
24. **Enright, M. C., D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann and B. G. Spratt.** 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** (11): 7687–7692.
25. **Enright, M. C. and B. G. Spratt.** 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* **7** (12): 482–487.

26. **Enright, M. C. and N. P. J. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. **38** (3): 1008–1015.
27. **Espadinha, D., N. A. Faria, M. Miragaia, L. M. Lito, J. Melo-Cristino, H. de Lencastre and M. Otto.** 2013. Extensive Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the Hospital and the Community in a Country with a High Prevalence of Nosocomial MRSA. *PLoS ONE*. **8** (4): e59960.
28. **Fitzgerald, J. R., D. E. Sturdevant, S. M. Mackie, S. R. Gill and J. M. Musser.** 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: Insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **98** (15): 8821–8826.
29. **Fleischer, B. and H. Schrezenmeier.** 1988. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *J. Exp. Med.* **167** (5): 1697–1707.
30. **Fuqua, C. and E. P. Greenberg.** 2002. Signalling: Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3** (9): 685–695.
31. **Garcia-Castellanos, R.** 2003. Three-dimensional Structure of Mecl: Molecular basis for transcriptional regulation of staphylococcal methicillin resistance. *Journal of Biological Chemistry*. **278** (41): 39897–39905.
32. **Ghebremedhin, B., W. König and B. König.** 2005. Heterogeneity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains at a German university hospital during a 1-year period. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24** (6): 388–398.
33. **Ghebremedhin, B., M. O. Olugbosi, A. M. Raji, F. Layer, R. A. Bakare, B. König and W. König.** 2009. Emergence of a Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain with a Unique Resistance Profile in Southwest Nigeria. *Journal of Clinical Microbiology*. **47** (9): 2975–2980.
34. **Gordon, R. J. and F. D. Lowy.** 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin. Infect. Dis.* **46** (S5): S350.
35. **Gouaux, E., M. Hobough and L. Song.** 1997. alpha-Hemolysin, gamma-hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: distant in sequence but similar in structure. *Protein Sci.* **6** (12): 2631–2635.
36. **Grundmann, H., D. M. Aanensen, C. C. van den Wijngaard, B. G. Spratt, D. Harmsen, A. W. Friedrich and H. F. Chambers.** 2010. Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis. *PLoS Med.* **7** (1): e1000215.
37. **Harmsen, D., H. Claus, W. Witte, J. Rothgänger, H. Claus, D. Turnwald and U. Vogel.** 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* **41** (12): 5442–5448.

38. Herold, B. C., L. C. Immergluck, M. C. Maranan, D. S. Lauderdale, R. E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C. D. Leitch and R. S. Daum. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*. **279** (8): 593–598.
39. Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda and T. Ito. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **9** (10): 486–493.
40. Hirschhausen, N. 2010. *Staphylococcus aureus*, 19 Sep. 2010. URL: <http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/190.htm> (Stand: 09 Jul. 2013).
41. Ho, C.-M., M.-W. Ho, C.-Y. Lee, N. Tien and J.-J. Lu. 2012. Clonal spreading of methicillin-resistant SCCmec *Staphylococcus aureus* with specific spa and dru types in central Taiwan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31** (4): 499–504.
42. Hof, H. and R. Dörries. 2009. *Medizinische Mikrobiologie*, pp. 310-318. 4th edn. Thieme, Stuttgart.
43. Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn and K. Hiramatsu. 2001. Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45** (5): 1323–1336.
44. IWG-SCC. 2010. *SCCmec SCC types EN*, 11 Sep. 2010. URL: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html (Stand: 23 Apr. 2013).
45. Jarraud, S., G. J. Lyon, A. M. Figueiredo, G. Lina, L. Gérard, F. Vandenesch, J. Etienne, T. W. Muir and R. P. Novick. 2000. Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182** (22): 6517–6522.
46. Jarraud, S., C. Mougel, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne and F. Vandenesch. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* **70** (2): 631–641.
47. Jevons, M. P. 1961. “Celbenin”-resistant staphylococci. *British Medical Journal* (1): 124–125.
48. Ji, G., R. C. Beavis and R. P. Novick. 1995. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** (26): 12055–12059.
49. Katayama, Y., T. Ito and K. Hiramatsu. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44** (6): 1549–1555.
50. Kim, T., J. Yi, K. H. Hong, J.-S. Park and E.-C. Kim. 2011. Distribution of Virulence Genes in spa Types of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Patients in Intensive Care Units. *Korean J Lab Med.* **31** (1): 30.

51. **Klebens, R. M., J. R. Edwards, F. C. Tenover, L. C. McDonald, T. Horan and R. Gaynes.** 2006. Changes in the Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Intensive Care Units in US Hospitals, 1992-2003. *Clinical Infectious Diseases.* **42** (3): 389–391.
52. **Kresken, M., D. Hafner and B. Körber-Irrgang.** 2010. PEG-Resistenzstudie 2010: Epidemiologie und Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern aus dem Hospitalbereich gegenüber Antibiotika. *Paul Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie, Germany.*
53. **Layer, F., C. Cuny, B. Strommenger, G. Werner and W. Witte.** 2012. Aktuelle Daten und Trends zu Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Bundesgesundheitsbl.* **55** (11-12): 1377–1386.
54. **Layer, F., B. Ghebremedhin, K.-A. Moder, W. König and B. König.** 2006. Comparative Study Using Various Methods for Identification of *Staphylococcus* Species in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* **44** (8): 2824–2830.
55. **Lee, L. G., S. L. Spurgeon, C. R. Heiner, S. C. Benson, B. B. Rosenblum, S. M. Menchen, R. J. Graham, A. Constantinescu, K. G. Upadhy and J. M. Cassel.** 1997. New energy transfer dyes for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* **25** (14): 2816–2822.
56. **Lencastre, H. d., D. Oliveira and A. Tomasz.** 2007. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr. Opin. Microbiol.* **10** (5): 428–435.
57. **Lim, K. T., Y. A. Hanifah, M. Y. Mohd Yusof and K. L. Thong.** 2012. Investigation of toxin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. *Trop Biomed.* **29** (2): 212–219.
58. **Lina, G., Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J and Vandenesch F.** 2003. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal agr alleles. *Appl. Envir. Microbiol* (69): 18–23.
59. **Lina, G., Y. Piémont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch and J. Etienne.** 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **29** (5): 1128–1132.
60. **Linde, H. and N. Lehn.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) - diagnostics. *Dtsch med Wochenschr.* **130** (11): 582–585.
61. **Lindsay, J. A., A. Ruzin, H. F. Ross, N. Kurepina and R. P. Novick.** 1998. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* **29** (2): 527–543.
62. **Liu, C., A. Bayer and S. E. Cosgrove, et al.** 2011. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Clinical Infectious Diseases.* **52** (3): e18.
63. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med.* **339** (8): 520–532.

64. **Lowy, F. D.** 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* **111** (9): 1265–1273.
65. **Madigan, M. T., J. Parker, T. D. Brock and J. M. Martinko.** 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. International Edition Pearson Education, Inc., New Jersey.
66. **Marimón, J. M., M. Villar, J. M. García-Arenzana, I. d. La Caba and E. Pérez-Trallero.** 2012. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* carrying the panton-valentine leucocidin genes in northern Spain. *J. Infect.* **64** (1): 47–53.
67. **Ma, X. X., T. Ito, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, P. Chongtrakool, S. Boyle-Vavra, R. S. Daum and K. Hiramatsu.** 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46** (4): 1147–1152.
68. **McCormick, J. K., J. M. Yarwood and P. M. Schlievert.** 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: An Update. *Annu. Rev. Microbiol.* **55** (1): 77–104.
69. **McKinney, T. K., V. K. Sharma, W. A. Craig and G. L. Archer.** 2001. Transcription of the Gene Mediating Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) Is Corepressed but Not Coinduced by Cognate *mecA* and beta -Lactamase Regulators. *Journal of Bacteriology.* **183** (23): 6862–6868.
70. **Mejía, C., J. Zurita and M. Guzmán-Blanco.** 2010. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz. J. Infect. Dis.* **14** Suppl 2 S79-86.
71. **Micek, S. T.** 2007. Alternatives to Vancomycin for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Clinical Infectious Diseases.* **45** (Supplement 3): S184.
72. **Middendorf, L., Humphrey R. P. G, Narayanan N and Roemer S. C.** 2001. *Sequencing technology*, pp. 165-208. In C. W. Sensen, eds., *Genomics and bioinformatics*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
73. **Novick, R. P.** 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology.* **48** (6): 1429–1449.
74. **Novick, R. P., H. F. Ross, S. J. Projan, J. Kornblum, B. Kreiswirth and S. Moghazeh.** 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* **12** (10): 3967–3975.
75. **Oliveira, D. C. and H. d. Lencastre.** 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46** (7): 2155–2161.
76. **Parker, M. T. and S. P. Lapage.** 1957. Penicillinase production by *Staphylococcus aureus* strains from outbreaks of food poisoning. *J. Clin. Pathol.* **10** (4): 313–317.
77. **Prevost, G., P. Couppie, P. Prevost, S. Gayet, P. Petiau, B. Cribier, H. Monteil and Y. Piemont.** 1995. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J. Med. Microbiol.* **42** (4): 237–245.

78. **Rasigade, J., F. Laurent, G. Lina, H. Meugnier, M. Bes, F. Vandenesch, J. Etienne and A. Tristan.** 2010. Global Distribution and Evolution of Panton-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981–2007. *J. Infect. Dis.* **201** (10): 1589–1597.
79. **Reyes, J., S. Rincón and L. Díaz, et al.** 2009. Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Sequence Type 8 Lineage in Latin America. *Clin. Infect. Dis.* **49** (12): 1861–1867.
80. **Robert Koch-Institut. Kiehl, W., Steffens, I., Fehrmann, S.** 2003. Staphylokokken-Infektionen in Deutschland im Jahr 2002. *Epidemiologisches Bulletin.*
81. **Rodrigues, M. V. P., C. M. C. B. Fortaleza, D. F. M. Riboli, R. S. Rocha, C. Rocha and M. d. L. R. d. S. d. Cunha.** 2013. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn unit from Brazil. *Burns.*
82. **Rossi, F., P. García, B. Ronzon, D. Curcio and M. J. Dowzicky.** 2008. Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004–2007) and in vitro activity of the glycylicline tigecycline and of other antibiotics. *Braz. J. Infect. Dis.* **12** (5): 405–415.
83. **Sambrook J, Fritsch E.F and Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
84. **Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology.* **24** 104–108.
85. **Schleifer, K. H. and J. A. Bell.** 2010. VALIDATION LIST no. 132. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (60): 469–472. *Family VIII. Staphylococcaceae fam. nov* [In: de Vos, p. G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer and W. B. Whitman (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 3 (The Firmicutes), Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2009, p. 392.].
86. **Schuenck, R. P., F. S. Cavalcante, E. Emery, M. G.-d. Marval and K. R. N. d. Santos.** 2012. *Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **65** (3): 501–504.
87. **Shands, K. N., G. P. Schmid and B. B. Dan, et al.** 1980. Toxic-shock syndrome in menstruating women: association with tampon use and *Staphylococcus aureus* and clinical features in 52 cases. *N. Engl. J. Med.* **303** (25): 1436–1442.
88. **Sharma, V. K., C. J. Hackbarth, T. M. Dickinson and G. L. Archer.** 1998. Interaction of native and mutant Mecl repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. *J. Bacteriol.* **180** (8): 2160–2166.
89. **Song, J.-H., P.-R. Hsueh and D. R. Chung, et al.** 2011. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **66** (5): 1061–1069.

90. **Stefani, S., D. R. Chung, J. A. Lindsay, A. W. Friedrich, A. M. Kearns, H. Westh and F. M. MacKenzie.** 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **39** (4): 273–282.
91. **Tenover, F. C., I. A. Tickler, R. V. Goering, B. N. Kreiswirth, J. R. Mediavilla and D. H. Persing.** 2012. Characterization of Nasal and Blood Culture Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients in United States Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **56** (3): 1324–1330.
92. **Thomas, D. Y., S. Jarraud, B. Lemerrier, G. Cozon, K. Echasserieau, J. Etienne, M.-L. Gougeon, G. Lina and F. Vandenesch.** 2006. Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins U2 and V, Two New Staphylococcal Superantigens Arising from Recombination within the Enterotoxin Gene Cluster. *Infection and Immunity*. **74** (8): 4724–4734.
93. **Todd, J., M. Fishaut, F. Kapral and T. Welch.** 1978. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I *Staphylococci*. *Lancet*. **2** (8100): 1116–1118.
94. **Tokajian, S. T., P. A. Khalil, D. Jabbour, M. Rizk, M. J. Farah, F. A. Hashwa and G. F. Araj.** 2010. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in Lebanon. *Epidemiol. Infect.* **138** (5): 707–712.
95. **Uhlén, M., B. Guss, B. Nilsson, S. Gatenbeck, L. Philipson and M. Lindberg.** 1984. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J. Biol. Chem.* **259** (3): 1695–1702.
96. **Urwin, R. and M. C. J. Maiden.** 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* **11** (10): 479–487.
97. **van Cleef, B. A. G. L., J. A. J. W. Kluytmans, B. H. B. van Benthem, A. Haenen, J. Monen, I. Daniels-Haardt, A. Jurke, A. W. Friedrich and H. de Lencastre.** 2012. Cross Border Comparison of MRSA Bacteraemia between The Netherlands and North Rhine-Westphalia (Germany): A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE*. **7** (8): e42787.
98. **Vandenesch, F., G. Lina and T. Henry.** 2012. *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Front. Cell. Inf. Microbio.* **2**.
99. **Wang, L. X., Z. D. Hu, Y. M. Hu, B. Tian, J. Li, F. X. Wang, H. Yang, H. R. Xu and Y. C. Li.** 2013. Molecular analysis and frequency of *Staphylococcus aureus* virulence genes isolated from bloodstream infections in a teaching hospital in Tianjin, China. *Genet. Mol. Res.* **12** (AOP).

Publikation

Zur Veröffentlichung eingereichtes Manuskript aus der vorliegenden Dissertationsarbeit:

“Genotypic and phenotypic analysis of *Staphylococcus aureus* isolates in Panama.”

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei all jenen, die mir in den letzten Jahren bei dieser Dissertation zur Seite gestanden und diese ermöglicht haben.

Mein Dank gilt insbesondere meinem Betreuer, Priv.-Doz. Dr. med. Dipl.-Biochem. Beniam Ghebremedhin, für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die tatkräftige Unterstützung und seine stetige Erreichbarkeit.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. Dirk Schlüter für die Möglichkeit, in seinem Institut zu promovieren.

Herzlich bedanken für die Mithilfe und das freundliche Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie, insbesondere bei Lysann Hamel, die mich mit wertvollen Ratschlägen und Geduld in die Künste der mikrobiologischen Forschung eingearbeitet hat.

Ebenfalls meinen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Siegfried Kropf aus dem Institut für Biometrie und Medizinische Informatik aussprechen, der mir bei der Erstellung der statistischen Analysen eine große Hilfe gewesen ist.

Ich danke Dr. med. Anke Mertens, die mir mit ihren unzähligen Tipps zum Verfassen der Dissertation zur Seite gestanden hat.

Des Weiteren gilt mein Dank dem Referat für Forschung der Medizinischen Fakultät Magdeburg für die Ermöglichung des Promotionsstipendiums im Rahmen der Leistungsorientierten Mittelvergabe.

Diese Dissertation sowie auch mein gesamtes Studium wären nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung meiner Eltern, Manfred und Elke Heeren. Sie haben mir mein Studium nicht nur ermöglicht, sondern mich auch während des Studiums ermutigt und mir die Kraft gegeben, auch schwierige Phasen zu bestehen.

Dem Rest meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre unzähligen Ratschläge, Aufmunterungen und ihr Verständnis während der Arbeit an meiner Dissertation.

Ehrenerklärung

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

**PHÄNO- UND GENOTYPISCHE UNTERSUCHUNGEN VON
METHICILLIN-SENSIBLEN UND -RESISTENTEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS-ISOLATEN AUS PANAMA**

im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch Priv.-Doz. Dr. med. Dipl.-Biochem. Beniam Ghebremedhin und den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie 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 01.02.2015

Astrid Heeren

Lebenslauf

Zur Person

Name:	Astrid Elke Heeren
Geburtsdatum:	21.10.1986
Geburtsort:	Emden/Ostfriesland
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Schulischer Werdegang

1993 – 1997	Grundschule Ludgeri Helmstedt
1997 – 1999	Orientierungsstufe Lutherschule Helmstedt
1999 – 2006	Gymnasium Julianum Helmstedt
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife (Abitur) am 27.06.2006

Universitärer Werdegang

2006 – 2012	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 09.09.2008
WS 2008	Auslandssemester in englischer Sprache am Leids Universitair Medisch Centrum der Universität in Leiden, den Niederlanden
Abschluss	Staatsexamen am 06.11.2012

Praktisches Jahr (PJ)

1. Chirurgie	08/2011 – 10/2011 Auslands-PJ in der Kolorektalchirurgie (Mater Misericordiae University Hospital Dublin, Irland) 10/2011 – 12/2012 Allgemein- und Viszeralchirurgie (Johanniter-Krankenhaus Stendal)
2. Innere Medizin	12/2011 – 03/2012 Kardiologie und Geriatrie (Johanniter-Krankenhaus Stendal)
3. Urologie und Kinderurologie	03/2012 – 07/2012 Urologie und Kinderurologie (Johanniter-Krankenhaus Stendal)

Promotion, Stipendium und Beruf

2010 – 2014	Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg unter der Betreuung von Priv.-Doz. Dr. med. Dipl.-Biochem. Beniam Ghebremedhin
12/2012 – 09/2013	Promotionsstudium
02/2013 – 07/2013	Doktorandenstipendium im Rahmen der Leistungsorientierten Mittelvergabe (LOM) an der Medizinischen Fakultät Magdeburg
Seit 10/2013	Assistenzärztin in der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Klinikum Magdeburg gGmbH

Magdeburg, den 01.02.2015

Anhang

Nr.	Spezies	PEN	OXA	SXT	TET	ERY	CLI	MOX	GEN	POS	FUS	LEV	LIN	RIF	TOB	SEA	SEB	SEC	SED	SEG	SEH	SEE	SEI	SEJ	TST	HIG A	HIG B	LUK E	LUK PV	SCC	AGR	SPT	ST
1	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	I	I	1216	ST59	
2	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1148	ST72	
3	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	MSSA	IV	1940	ST425	
4	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
5	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	MSSA	III	1175	ST1	
6	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
7	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	MSSA	III	1175	ST1	
8	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
9	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	MSSA	III	1127	ST1	
10	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	MSSA	IV	1940	ST425	
11	<i>S. aureus</i>	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	MSSA	I	1189	ST188	
12	<i>S. aureus</i>	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	MSSA	I	1216	ST59	
13	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
14	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1148	ST72	
15	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1148	ST72	
16	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1148	ST72	
17	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1008	ST8	
18	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
19	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	III	443	ST5	
20	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1004	ST45	
21	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
22	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
23	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
24	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1004	ST45	
25	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1216	ST59	
26	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	MSSA	III	1045	ST5	
27	<i>S. hominis</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	n.a.	/	/	/	
28	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1004	ST45	
29	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1216	ST59	
30	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1008	ST8	
31	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
32	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	n.a.	/	/	/	
33	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
34	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
35	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1004	ST45	
36	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1004	ST45	
37	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1148	ST72	
38	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	MSSA	I	1008	ST8	
39	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1004	ST45	
40	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1004	ST45	
41	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
42	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8	
43	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1148	ST72	
44	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1148	ST72	
45	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	I	I	1004	ST45	

Anhang 1 Auflistung der Isolate 1 bis 45 mit den Ergebnissen der PCR sowie der Sequenzierung

Nr.	Spezies	PEN	OXA	SXT	TET	ERY	CLI	MOX	GEN	FOS	FUS	LEV	LIN	RIF	TOB	sea	seb	sec	sed	seg	seh	see	sei	sej	tst	higA	higB	lukP	lukE	lukPV	SCC	agr	spa	ST
46	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
47	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
48	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
49	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
50	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	MSSA	I	1211	ST8	
51	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1008	ST8	
52	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
53	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
54	<i>S. leifthus</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1148	ST72	
55	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	III	1443	ST5	
56	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
57	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1148	ST72	
58	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
59	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
60	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	MSSA	I	1004	ST45	
61	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
62	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
63	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1148	ST72	
64	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	III	1443	ST5	
65	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1148	ST72	
66	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1148	ST72	
67	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
68	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1148	ST72	
69	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1148	ST72	
70	TOT	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
71	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1148	ST72	
72	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	III	1443	ST5	
73	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
74	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
75	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
76	<i>K. kristinae</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
77	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	MSSA	I	1008	ST8	
78	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
79	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
80	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
81	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
82	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	III	1443	ST5	
83	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
84	<i>S. epidermidis</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
85	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
86	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	I	1004	ST45	
87	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	
88	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	I	III	1443	ST5	
89	<i>K. kristinae</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
90	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8	

Anhang 2 Auflistung der Isolate 46 bis 90 mit den Ergebnissen der PCR sowie der Sequenzierung

Nr.	Spezies	PEN	OXA	SKT	TET	ERY	CLI	MOX	GEN	FOS	FUS	LEV	LIN	RIF	TOB	sea	seb	sec	sed	seg	seh	see	sei	sej	tst	higA	higB	lukE	lukPV	SCC	agr	spa	ST
91	<i>S. epidermidis</i>	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
92	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	pos	IV	I	1148	ST72	
93	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8		
94	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	IV	I	1148	ST72		
95	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	IV	I	1004	ST45		
96	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	IV	I	1024	ST8		
97	<i>gram neg.</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
98	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8		
99	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	I	III	1443	ST15			
100	<i>S. aureus</i>	R	R	S	I	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	I	III	1443	ST15			
101	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	I	III	1443	ST15			
102	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	MSSA	III	1127	ST1				
103	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	I	I	1004	ST45			
104	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	IV	I	1008	ST8			
105	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	I	III	1443	ST15			
106	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	MSSA	III	1127	ST1			
107	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8			
108	TOT	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
109	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8			
110	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8			
111	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	IV	I	1008	ST8			
112	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	MSSA	III	1127	ST1			
113	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	MSSA	III	1127	ST1			
114	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	I	I	1004	ST45			
115	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	I	I	1004	ST45			
116	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	I	I	1004	ST45			
117	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	I	I	1004	ST45			
118	<i>K. kristinae</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
119	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	I	III	1443	ST5			
120	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	IV	I	1148	ST72			
121	<i>S. sclarii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
122	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	IV	I	1148	ST72			
123	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	neg	pos	IV	I	1008	ST8		
124	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	MSSA	I	1148	ST72				
125	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	I	I	1004	ST45			
126	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	I	III	1443	ST15			
127	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	I	I	1004	ST45			
128	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	I	I	1004	ST45			
129	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	IV	I	1148	ST72			
130	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	IV	I	1444	ST59			
131	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	neg	MSSA	I	1008	ST8			

Anhang 3 Auflistung der Isolate 91 bis 131 mit den Ergebnissen der PCR sowie der Sequenzierung