

Aus dem Robert Koch-Institut,  
Außenstelle Wernigerode,  
und dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
der Freien Universität Berlin

**Mikroevolution von Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) des Sequenztyps  
ST398  
bei Menschen und Nutztieren**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Anne Wittenberg  
Tierärztin aus Pasewalk

Berlin 2014  
Journal-Nr.: 3719

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Witte  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

livestock, man, methicillin-resistant, Staphylococcus aureus epidemiology,  
genotypes, genetic change, genetic analysis, public health

Tag der Promotion: 01.12.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-579-4

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

- Meinen Eltern -

Ohne einen Weg gegangen zu sein, wirst du nie erfahren, ob ihn zu gehen sich gelohnt hätte.

W.J. Schmidt

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>II.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>III.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>Schrifttum</b>	<b>13</b>
2.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.1.1.	Eigenschaften von <i>Staphylococcus aureus</i> und MRSA	13
2.1.2.	Einteilung von MRSA	14
2.2.	Pathogenität und Virulenzeigenschaften von <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.3.	Resistenzentwicklung	17
2.3.1.	β-Laktam-Antibiotika	18
2.3.2.	Nicht-β-Laktam-Antibiotika	18
2.4.	Molekulare Typisierung	21
2.4.1.	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	21
2.4.2.	Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST)	22
2.4.3.	<i>Spa</i> -Typisierung	23
2.4.4.	<i>SCCmec</i> -Typisierung	24
2.4.5.	<i>Denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC)</i>	24
2.5.	Populationsstruktur und klonale Verbreitung von MRSA	26
2.5.1.	Populationsstruktur	26
2.5.2.	Klonale Verbreitung von MRSA und MSSA in der Tiermedizin	30
2.5.3.	Charakteristika von MRSA-Isolaten des CC398	39
2.5.4.	Risiken für den Menschen – das zoonotische Potential	41
<b>3.</b>	<b>Material</b>	<b>44</b>
3.1	Probenmaterial und –herkunft	44
3.2	Geräte	49
3.3	Chemikalien und Enzyme	50
3.4	Nährmedien	50
3.5	Verwendete Antibiotika	51
3.6.	Verwendete Software	52

<b>4. Methoden</b>	<b>53</b>
4.1. Bakterienanzucht und Speziesdiagnostik	53
4.2. Phänotypische Antibiotikaresistenzbestimmung	54
4.3. DNA-Präparation	55
4.4. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	56
4.5. Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST)	60
4.6. <i>spa</i> -Typisierung	61
4.7. <i>SCCmec</i> -Typisierung	62
4.8. Sekundäre MSSA	62
4.8.1. Microarray Analysen	63
4.8.2. PCR-Methoden zum Nachweis sekundärer MSSA	66
4.9. <i>dHPLC</i>	69
4.9.1. Amplifizierung der ausgesuchten DNA-Fragmente (Loci) mittels PCR	69
4.9.2. Aufreinigung der PCR-Produkte und Nachweis mittels Gelelektrophorese	69
4.9.3. Ablauf der <i>dHPLC</i>	69
4.9.4. Sequenzierung mittels Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	71
4.9.5. Datenanalyse	72
4.10. Transmissionsstudie	73
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>73</b>
5.1. Isolate	73
5.2. Nachweis und Analyse der Einzelnukleotidunterschiede	75
5.3. Phylogenetische Analysen	76
5.3.1. Minimum-Spanning-Tree	76
5.3.2. Phylogeographie	78
5.3.3. Wirtsspezifität	82
5.3.4. <i>Spa</i> -Typen	84
5.3.4.1. MLST-Analyse einzelner Isolate	85
5.3.5. <i>SCCmec</i> -Typen	85
5.3.6. Verteilung von MSSA und MRSA – Nachweis sekundärer MSSA	86
5.4. Nachweis von Synonymen und Nicht-synonymen Substitutionen	88
5.5. Demographische Analyse der Populationsgröße	91
5.6. Transmissionsstudie	92
5.7. Pulsfeldgelelektrophorese	96

<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>101</b>
6.1.	Diskussion - Mikroevolution des klonalen Komplexes CC398	101
6.1.1	Phylogeographie des klonalen Komplexes CC398	101
6.1.2	Wirtsspezifität – tierartsspezifische Cluster?	103
6.1.3.	<i>spa</i> -Typen, <i>SCCmec</i> , Verteilung MSSA – MRSA	105
6.1.4.	Nachweis von Synonymen und Nicht-synonymen Substitutionen und demographische Analyse der Populationsgröße	106
6.1.5.	Transmissionsstudie	107
6.1.6.	Pulsfeldgelelektrophorese	109
6.1.7.	Ausbreitung von MRSA des CC398	109
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>8.</b>	<b>Summary</b>	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>Referenzen</b>	<b>113</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang</b>	<b>125</b>
	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>133</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>134</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>135</b>

## II. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A.bidest.	Aqua bidestilata
<i>aac6'' - aph2''</i>	Resistenzgen für den Resistenzmechanismus gegen Gentamycin
<i>arcC</i>	MLST-Locus (carbamate kinase, engl.)
<i>aroE</i>	MLST-Locus (shikimate dehydrogenase, engl.)
bp	Basenpaare
BURST	Based Upon Related Sequence Types (engl.)
ca.	circa
CA-MRSA	in der Bevölkerung auftretende MRSA (community acquired, engl.)
CC	klonaler Komplex (clonal complex, engl.)
<i>ccrA-1</i>	Rekombinasegen für cassette chromosome recombinase Typ A1
<i>ccrA-2</i>	Rekombinasegen für cassette chromosome recombinase Typ A2
<i>ccrA-3</i>	Rekombinasegen für cassette chromosome recombinase Typ A3
<i>ccrAA-MRSAZH47</i>	Rekombinasegen für cassette chromosome recombinase Typ A ZH47
<i>ccrA-4</i>	Rekombinasegen für cassette chromosome recombinase Typ A4
<i>ccrB-1</i>	Rekombinasegen für cassette chromosome recombinase Typ B1
<i>ccrB-2</i>	Rekombinasegen für cassette chromosome recombinase Typ B2
<i>ccrB-3</i>	Rekombinasegen für cassette chromosome recombinase Typ B3
<i>ccrB-4</i>	Rekombinasegen für cassette chromosome recombinase Typ B4
<i>ccrC</i>	Rekombinasegen für cassette chromosome recombinase Typ C
<i>dfrB</i>	Resistenzgen des Resistenzmechanismus gegen Sulfonamide/Trimethoprim
DLV	double locus variants (engl.)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
<i>ermA, ermB, ermC</i>	Resistenzgene für Mechanismen gegen Makrolide, Lincosamide, Streptomycin
et al.	et al. (und Mitarbeiter)
<i>far1</i>	Gen kodiert für Resistenzmechanismus gegen Fusidinsäure
FnbA, FnbB	Fibronektin-bindendes Protein A und B
<i>glpF</i>	MLST-Locus (glycerol kinase, engl.)
<i>gmk</i>	MLST-Locus (guanylate kinase, engl.)
<i>griA, griB</i>	Gene kodieren für Topoisomerase IV
<i>gyrA, gyrB</i>	Gene kodieren für DNA-Gyrasen A und B
HA-MRSA	Krankenhaus-adaptierte MRSA (hospital acquired, engl.)
HCA-MRSA	Hospital-acquired community onset MRSA, engl.
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
Kbp	Kilobasenpaare
KBE	Kolonie-bildende Einheit
kDa	1000 Dalton, Einheit der molekularen Masse
<i>kdpA-SCC</i>	Kaliumtransportierende ATPase
<i>kdpB-SCC</i>	Kaliumtransportierende ATPase
<i>kdpC-SCC</i>	Kaliumtransportierende ATPase
<i>kdpD-SCC</i>	Histidinkinase
<i>kdpE-SCC</i>	Transkriptionelles regulatorisches Protein des KDP Operon
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
LA-MRSA	mit der Landwirtschaft assoziierte MRSA, livestock-associated, engl.
<i>lukS-lukF</i>	PVL-kodierende Gene
<i>mecA</i>	Gen kodiert für Resistenz gegen Methicillin, Oxacillin u $\beta$ -Lactame

<i>mecR</i>	Gen kodiert für Signal Transducer Protein MecR1
<i>mecR_truncated</i>	Gen kodiert für Signal Transducer Protein MecR_truncated
<i>mecI</i>	Gen kodiert für Methicillinresistenz Regulationsprotein
<i>merA</i>	Resistenzgen kodiert für Quecksilber Reduktase
<i>merB</i>	Resistenzgen kodiert für Alkylquecksilber Lyase
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
min.	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mol	Einheit der Stoffmenge
MLS-Antibiotika	Makrolid-Lincosamid-Streptogramin-Antibiotika
MLST	Multi-Locus-Sequence-Typisierung
MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
<i>msrA</i>	Resistenzgen für Mechanismus gegen Makrolide
MSSA	Methicillin-sensibler <i>S. aureus</i>
MST	Minimum-Spanning-Tree
NaCl	Natriumchlorid
<i>norA</i>	Resistenzgen für Effluxpumpen
ORF	Open reading frame (engl.)
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PCR	Polymerase chain reaction (engl.)
PFGE	Pulsfeld-Gel-Elektrophorese
pH	Potentium hydrogenii
<i>pta</i>	MLST-Locus (phosphate acetyltransferase, engl.)
PVL	Panton-Valentine Leukozidin
RKI	Robert Koch-Institut
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCC <i>mec</i>	Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> (engl.)
SEA-SEE	Staphylokokken-Enterotoxine A-E
<i>sea-seq</i>	Staphylokokken-Enterotoxin A bis Q-kodierende Gene
SE	Staphylokokken-Enterotoxine
SET	Staphylokokken-Exotoxin-like-Protein
SLV	single locus variants (engl.)
<i>SmaI</i>	PFGE-Restriktionsenzym für <i>S. aureus</i>
<i>Spa</i>	Protein A-kodierendes Gen von <i>S. aureus</i>
SSSS	Staphylococcal-Scalded -Skin-Syndrome (engl.)
ST	Sequenztyp
subsp.	Subspezies
<i>sulA</i>	Resistenzgen des Resistenzmechanismus gegen Sulfonamide/Thrimethoprim
ta	Annealing temperature (engl.)
Tab.	Tabelle
TBE	Pufferlösung mit Tris-Borsäure und EDTA
TE	Pufferlösung mit Tris-HCl, EDTA
<i>tetK</i>	Resistenzgen für den Resistenzmechanismus gegen Tetracycline
<i>tetM</i>	Resistenzgen für den Resistenzmechanismus gegen Tetracycline
tp	Polymerase temperature (engl.)
<i>tpi</i>	MLST-Locus (triosephosphate isomerase, engl.)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSS	Toxic-Shock-Syndrom
TSST	Toxic-Shock-Syndrom-Toxin
<i>tst</i>	TSS-kodierendes Gen

UK	United Kingdom
<i>ugpQ</i>	Resistenzgen für Glycerophosphoryldiesterphosphodiesterase
U/min.	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
<i>vanA</i>	Resistenzgen kodiert für Mechanismus gegen Vancomycin
Vol.	Volumen
<i>ygil</i>	MLST-Locus (acetyl coenzyme A acetyltransferase, engl.)
z.B.	zum Beispiel
z.Z.	zum Zeitpunkt
%	Prozent
°C	Grad Celsius

### III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Verwandtschaftliche Beziehungen der klonalen Komplexe von <i>S. aureus</i>	Seite 23
Abb. 2:	Populationsstruktur von <i>S. aureus</i> basierend auf MLST Sequenzdaten	Seite 28
Abb. 3:	Ergebnisbild der Analyse der DNA des Isolates 08-00360 mittels Microarray	Seite 65
Abb. 4:	Schmelzkurve <i>dHPLC</i>	Seite 70
Abb. 5:	Alignment für ausgesuchte Isolate und den Referenzstamm für den Locus 215	Seite 75
Abb. 6:	<i>MST</i> Haplotypen	Seite 77
Abb. 7:	<i>MST</i> in Korrelation mit der Phylogeographie aller Isolate	Seite 80
Abb. 8:	<i>MST</i> in Korrelation mit der Verteilung der Spezies aller Isolate	Seite 82
Abb. 9:	<i>MST</i> in Korrelation mit der Verteilung der <i>spa</i> -Typen aller Isolate	Seite 84
Abb. 10:	<i>MST</i> in Korrelation mit der Verteilung von <i>SCCmec</i> aller Isolate	Seite 85
Abb. 11:	Zeitdiagramm Betrieb 2	Seite 93
Abb. 12:	Zeitdiagramm Betrieb 3	Seite 94
Abb.13/14:	Bilder von Pulsfeldgelen ausgesuchter Isolate	Seite 97/98
Abb. 15:	Dendrogramm für alle Isolate, die mittels PFGE untersucht wurden	Seite 99

### IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verschiedenen Resistenzmechanismen der Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika.	Seite 19/20
Tab. 2:	Überblick über die "Hauptklone" der Methicillin-resistenten <i>S. aureus</i> (MRSA)	Seite 27
Tab. 3:	Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei Pferden	Seite 31
Tab. 4:	Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei Schweinen	Seite 33
Tab. 5:	Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei Wiederkäuern	Seite 35
Tab. 6:	Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei Geflügel	Seite 36
Tab. 7:	Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei Haus- und Heimtieren	Seite 37
Tab. 8:	Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei anderen Tieren und Exoten	Seite 38
Tab. 9:	Verschiedene <i>spa</i> -Typen des CC398	Seite 40
Tab. 10:	Infektionen des Menschen verursacht durch <i>S.aureus</i> CC398	Seite 41/42
Tab. 11:	Isolate	Seite 45-48
Tab. 12:	Auflistung der verwendeten Geräte	Seite 49
Tab. 13:	Auflistung der verwendeten Chemikalien und Enzyme	Seite 50
Tab. 14:	Auflistung der verwendeten Antibiotika	Seite 51
Tab. 15:	Auflistung der verwendeten Software	Seite 52
Tab. 16:	Auflistung der Sublinien u. monophyletischen Untergruppen, einschließlich ihrer SNPs	Seite 81
Tab. 17:	Ergebnisse zur Untersuchung auf das Vorhandensein sekundärer MSSA	Seite 87/88
Tab. 18:	Polymorphismen, die in 100 untersuchten Loci gefunden wurden	Seite 89/90
Tab. 19:	Ergebnisse <i>BEAST</i> -Analyse	Seite 91
Tab. 20:	Isolatedaten Transmissionsstudie	Seite 92
Tab. 21:	Auflistung der einzelnen Primer für alle untersuchten Loci	A. 125-128
Tab. 22:	Multiplex PCR-Ansätze	A. 129/130
Tab. 23:	Primer für molekulare Typisierungsmethoden	A. 131/132

# 1. Einleitung

Die Gram-positiven Bakterien der Spezies *Staphylococcus aureus* gehören zu den am häufigsten auftretenden klinisch relevanten Bakterienarten. Neben der Besiedlung von Nase, Haut und Schleimhäuten kann dieser Erreger auch schwerste Infektionen wie Sepsis, Endokarditis oder beatmungsassoziierte Pneumonie herbeiführen, die in einzelnen Fällen auch mit dem Tod enden können [1]; [2]. *S. aureus* verfügt über eine Reihe unterschiedlicher Virulenzfaktoren, wie z. B. verschiedene Zellwand-assoziierte Faktoren, die eine Bindung an bestimmte Gewebe bzw. Oberflächen ermöglicht. Darüber hinaus schützen unter anderem Enzyme *S. aureus* vor körpereigenen Abwehrsystemen. Grund für die Zunahme schwerer Krankheitsverläufe bei Infektion mit *S. aureus* ist die sich dramatisierende Resistenzsituation gegenüber vielen Klassen von Antibiotika in den letzten Jahren. Mit dem Erwerb der Methicillin-Resistenz, welche durch das *mecA*-Gen kodiert ist, wurden Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) zu einem der bedeutendsten Infektionserreger überhaupt [3]. MRSA sind gemäß Definition des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010) resistent gegen alle  $\beta$ -Lactame, Cephalosporine und Carbapeneme. Zudem sind MRSA häufig auch resistent gegen Chinolone, Tetracycline, Aminoglykoside, Makrolide und Sulfonamide.

Auch in der Veterinärmedizin wird die Problematik der multiresistenten Erreger vermehrt zum Thema. Ein Fall von MRSA bei Tieren wurde erstmals 1972 bei einem Rind beschrieben, welches an Mastitis litt [4]. Seither treten immer wieder *Staphylococcus aureus* Infektionen bei Nutz- und Haustieren auf. Diese waren bisher vorwiegend mit typischen humanen MRSA-Stämmen assoziiert (z.B. ST22, „Barnim-Epidemiestamm“). Man geht davon aus, dass MRSA durch Transmission vom Menschen auf das Tier und umgekehrt weitergegeben werden können [5]; [6]; [7]; [8]; [9]; [10]; [11]; [12].

Im Jahre 2005 zeigte eine Untersuchung von nasalen Tupferproben eine unerwartet hohe Prävalenz für *S. aureus* eines bestimmten Sequenztyps bei Mastschweinen in niederländischen Schlachthanlagen [13]. Auch bei einigen der untersuchten Mitarbeiter dieses Betriebes konnten positive Nachweise erbracht werden. Nachfolgende Multi-Locus-Sequenz-Typisierungen (MLST) zeigten, dass diese Isolate dem Sequenztyp (ST) 398 angehören, welcher dem gleichnamigen klonalen Komplex (engl.: *clonal complex*, CC) zugeordnet wird. Durch vermehrte Nachweise bei Mensch und Tier rückte dieser Sequenztyp (bzw. CC) in das Interesse der Wissenschaft.

Obwohl dieser Erreger bei Schweinen eher selten zu Infektionen führt und meist als apathogener Besiedler bekannt ist, wurde bereits über zum Teil schwere Infektionen mit *S. aureus* CC398 bei Personen mit engem Kontakt zu landwirtschaftlich genutzten Tieren berichtet. Auch in Krankenhäusern bzw. einer Pflegeeinrichtung traten Infektionsgeschehen

auf [14]; [15]; [16]. In China wurden sogar erste Panton-Valentine Leukozidin (PVL)-positive Isolate des ST398 gefunden [17]; [18]. PVL ist ein bedeutendes Zytotoxin, das zu schweren Haut- und Weichteilgewebeschäden führen kann [19].

Die Möglichkeit der Aufnahme virulenzassoziierter Gene zeigt die Fähigkeit zur Adaptation dieses Bakteriums und weist somit auf die Wichtigkeit der näheren Untersuchung seiner Pathopotenzen hin [20]. Der enge Kontakt bei der Arbeit mit Nutztieren sowie die Einbindung von Haustieren in das Privatleben als Sportpartner, Therapietier, Begleiter oder Familienmitglied lässt mögliche Wege der Übertragung und Verbreitung von *S. aureus* erkennen. Studien zeigten, dass eine Exposition durch die Arbeit mit den besagten Tieren oder der Aufenthalt in deren Umgebung durchaus zu einem vielfach höheren Risiko der Besiedlung mit *S. aureus* CC398 führen kann [21]; [22].

Es wurden ebenfalls positive Nachweise von Methicillin-resistenten und Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) aus nasaler Besiedlung und Infektionen von anderen Nutz- (Rind, Saugkälber, Ziege) und Haustieren (Hund, Katze, Meerschwein) sowie von Pferden erbracht [23]; [24]; [25]; [26]; [27]; [28]; [7]. Die naheliegende Transmission zwischen verschiedenen Tierarten sowie dem Menschen deutet auf eine geringe Wirtsspezifität hin und verdeutlicht das von diesem Pathogen ausgehende zoonotische Potential. Des Weiteren stellt die weltweite Zunahme von Antibiotikaresistenzen die Human- und Veterinärmedizin ständig vor neue Probleme und Herausforderungen bei der Therapie von MRSA-bedingten Infektionsprozessen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Einblicke in die Mikroevolution von ausgewählten *S. aureus*-Isolaten des klonalen Komplexes CC398 mit Hilfe der Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen (engl.: *single nucleotide polymorphism*, SNP) zu gewinnen. Phylogenetische Beziehungen sollen nachvollzogen und dargestellt werden. Hierzu erfolgt die Analyse der evolutionären Populationsstruktur dieses sich rasch verbreitenden und bei Mastschweinen hochprävalenten MRSA-Stammes. Darüber hinaus werden bereits vorliegende Transmissionsstudien sowie Studien zur Verbreitung und zum geographischen Hintergrund von CC398-Isolaten durch diese Arbeit ergänzt.

## 2. Schrifttum

### 2.1. *Staphylococcus aureus*

#### 2.1.1. Eigenschaften von *Staphylococcus aureus* und MRSA

Im Jahre 1878 erkannte Robert Koch im Zuge der Untersuchungen zur "Ätiologie von Wundinfektionen", dass Gram-positive Kokken mit unterschiedlichen Wachstumsmustern, bestehend aus paarigen Anordnungen und Anordnungen in Ketten oder Trauben, verschiedene eitrige Krankheiten hervorrufen [29]. Wenig später entdeckte Alexander Ogston ebenfalls eine Vielzahl von traubenförmigen Kokken in Eiterungsprozessen. Diese erhielten ihren Namen nach ihrem Aussehen (Haufenkokken, griechisch *staphyle*: Weintraube) und wurden von daher als Staphylokokken bezeichnet [30]. Bakterien der Gattung *Staphylococcus* zählen zur Familie der *Staphylococcaceae*.

Sie sind Gram-positive, kugelförmige, unbewegliche Bakterien, die auch unter fakultativ anaeroben Bedingungen wachsen können. Sie besitzen einen Durchmesser von 0,5- 1,5 µm. *S. aureus* wachsen unter verschiedenen Umweltbedingungen, am besten allerdings bei Temperaturen zwischen 30 und 37°C. Auf fast allen Nährmedien zeigen sie ein Wachstum als grau-weiße bis grau-gelbe und auch gold-gelbe, runde Kolonien. Die pH-Resistenz sowie die hohe Tenazität gegen Wärme und Trockenheit macht *S. aureus* unempfindlich gegen potentiell nachteilige Umwelteinflüsse [31]; [32].

*S. aureus* ist ubiquitär verbreitet und besiedelt zumeist apathogen die Haut, Hautdrüsen und Schleimhäute von Menschen und Tieren. Etwa ein Drittel aller Menschen ist natürlicherweise mit diesem Bakterium besiedelt [33]; [34].

Staphylokokken bilden Katalase, welche die Wirkung von Sauerstoffradikalen hemmt und die Phagozytenaktivität verhindert. Sollte *S. aureus* durch Phagozyten aufgenommen worden sein, kann das Bakterium durch Aktivität der von ihm exprimierten Katalase überdauern.

Zur weiteren *S. aureus*-Differenzierung von anderen Staphylokokken Spezies (KNS) nutzt man u. a. den Nachweis der Plasmakoagulase. Dieses Oberflächen-assoziierte Exotoxin ist ein Virulenzfaktor, mit dem die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin im Blutplasma unterschiedlicher Spezies aktiviert wird. Dieser Faktor begünstigt die Anheftung und Etablierung der Staphylokokken im Organismus.

Mit der Entdeckung des Penicillins im Jahre 1928 und der Einführung in die Therapie von bakteriellen Infektionskrankheiten in den 1940er Jahren wurden Penicillin und andere Antinfektiva unter anderem als „Wunderheilmittel“ eingesetzt. Möglicherweise führte dies nachfolgend zu einer sehr raschen Akkumulation von Antibiotikaresistenzen. Auch gegen neue Antibiotika wie das Methicillin, das 1959 zur Behandlung von Penicillin-resistenten

*S. aureus* entwickelt wurde, zeigten sich nach wenigen Jahren Resistenzen. Bereits 1961 trat in Großbritannien der erste nachgewiesene, durch Aufnahme des *mecA*-Gens entstandene, Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) auf [35]. In kürzester Zeit kam es weltweit zu weiteren Nachweisen von MRSA. Doch MRSA sind *per definitionem* nicht nur resistent gegen alle  $\beta$ -Laktam Antibiotika, sie können darüber hinaus ebenfalls Resistenzmechanismen gegen eine Vielzahl anderer Substanzklassen besitzen [3].

Als typischer opportunistischer Infektionserreger kann *S. aureus* unter bestimmten Bedingungen (Hygienemängel, Immunsuppression, gestörte Schleimhautflora, usw.) schwere lokale und auch systemische Infektionen hervorrufen [36]. Heute zählt *S. aureus* zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen weltweit [37]; [38]. Das Infektionsspektrum dieser Bakterien ist dabei sehr weit gefasst, beinhaltet dabei aber pyogene Prozesse wie Furunkel und Karbunkel sowie generalisierte Infektionen wie Faszitiden, Sinusitiden, Osteomyelitiden sowie systemische Erkrankungen wie Pneumonien, Endokarditiden, katheterassoziierten Infektionen oder Sepsis [39]; [40]; [41]; [42]. Weiterhin zählen schwerwiegende toxinvermittelte Erkrankungen zum Krankheitsspektrum von *S. aureus*.

Zu den toxinvermittelten Erkrankungen zählen das *Toxic Shock Syndrome* (TSS) sowie das *Staphylococcal Scaled Skin Syndrome* (SSSS). Ein schnelles Erkennen und die unmittelbare Bekämpfung dieser Infektionen kann lebensrettend sein [43]; [44]; [45]. Eine weitere mögliche Ursache für Erkrankungen des Menschen stellt die Kontamination von Lebensmitteln mit Enterotoxin-bildenden *S. aureus* dar. Meist werden dabei hitzestabile Enterotoxine (A bis E) mit der Nahrung aufgenommen und führen schon nach kurzer Zeit zu Erbrechen, Durchfällen und Kreislaufschwäche [46]; [47].

### **2.1.2. Einteilung von MRSA**

Aus klinisch-epidemiologischer Sicht ist es sinnvoll, MRSA nach ihrer Herkunft einzuteilen. Die im Krankenhausmilieu verbreiteten HA-MRSA (*hospital-acquired MRSA*) zeichnen sich durch ihren nosokomialen (bedeutet "auf das Krankenhaus bezogen" bzw. "im Krankenhaus erworben") Hintergrund aus und treten in Verbindung mit bestimmten Risikofaktoren wie zum Beispiel einem längeren Krankenhausaufenthalt, einer langen Antibiotikatherapie, chronischen Haut- und Weichteilinfektionen, Dialysepflicht oder Katheterisierung auf [48]; [49]. HA-MRSA können epidemiologisch und regional von anderen MRSA unterschieden werden und zeigen in der Regel eine hohe Ausbreitungsfähigkeit [50]; [51]. Aufgrund kürzerer Krankenhausverweilzeiten können im Hospital erworbene MRSA häufig erst nach der Entlassung als Besiedler oder Infektionserreger in Erscheinung treten. Diese werden dann als HCA-MRSA (*hospital-acquired community onset MRSA*) (Bundesgesundheitsblatt, 2012) bezeichnet.

Im Gegensatz dazu werden seit Mitte der 1990-er Jahre vermehrt MRSA beschrieben, die ohne nosokomialen Zusammenhang auftreten und durch das Fehlen spezifischer hospital-assoziiertes Risikofaktoren bei den betroffenen Patienten charakterisiert sind [52]. Diese Infektionen treten in der Bevölkerung auf und werden *community-acquired MRSA* (CA-MRSA) genannt [53]. Sie verursachen schwere Haut- und Weichgewebeeinfektionen. Kinder, junge Erwachsene (vor allem Spieler von Teamsportarten), Drogenabhängige, Inhaftierte und Personen, die in der Gesundheitspflege tätig sind, besitzen wahrscheinlich aufgrund des häufigeren Kontakts zu gleichen Altersgruppen oder Personen im Allgemeinen ein höheres Risiko, mit CA-MRSA infiziert oder besiedelt zu sein [53].

CA-MRSA tragen meist *SCCmec*-Elemente des Typs IV und V und werden oft mit dem Panton-Valentine Leukozidin-Faktor in Zusammenhang gebracht. Durch den Eintrag in Krankenhäuser und andere kurative Einrichtungen haben CA-MRSA teilweise begonnen HA-MRSA an diesen Orten zu verdrängen [38]; [54].

Seit 2005 häufen sich Berichte über MRSA des klonalen Komplexes CC398 bei landwirtschaftlich genutzten Tieren, was zur Definition einer weiteren MRSA-Gruppe führte [24]; [13]; [7]; [55]; [17]. Diese MRSA wurden vor allem als nasale, apathogene Besiedler von Schweinen bekannt und durch den direkten Bezug zur Landwirtschaft wurde der Begriff *livestock-associated MRSA* (LA-MRSA) geprägt [56]; [57]. In den letzten Jahren wurden *S. aureus* des gleichen klonalen Komplexes jedoch ebenfalls bei Mastkälbern, Puten und Pferden festgestellt [25]; [26]; [58]; [28]; [7]; [59]. CC398-MRSA wurden aus der Umgebung der Tiere sowie dem Stallstaub und aus unterschiedlichen Fleischproben nach Anreicherung isoliert [60]; [61, 62]; [62].

Ebenfalls betroffen sind Haustierarten wie Hund und Katze, bei denen der positive Nachweis von CC398-MRSA möglich ist [7]; [23]; [63]. Darüber hinaus können *S. aureus* des CC398 ebenso Menschen besiedeln und infizieren [64]; [17]. Durch das Vermögen, verschiedene Wirte zu besiedeln oder zu infizieren, und die Fähigkeit, sich an diese verschiedenen Wirte anzupassen, wird dieser Sequenztyp von *S. aureus* in die Gruppe der *extended host spectrum genotypes* (EHSGs) eingeordnet [65].

## 2.2. Pathogenität und Virulenzeigenschaften von *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken zeichnen sich durch verschiedene Pathogenitätsfaktoren aus. Man unterscheidet dabei durch zellwandassoziierte Proteine hervorgerufene Reaktionen bzw. durch extrazelluläre Toxine verursachte charakteristische Krankheitsbilder [66].

Zu den zellwandassoziierten Proteinen zählen das Protein A, das Fibronektin-bindende Protein sowie Kollagen-bindende Proteine und Fibrinogen-bindende Proteine (Clumping Faktor A+B). Das Protein A bindet unspezifisch Immunglobulin G (Ig G) über dessen Fc-Teil. Dadurch werden Antikörper abgefangen, die Opsonierung behindert und phagozytierende Zellen gehemmt. Die Fibronektin-bindenden Proteine A und B (Fnb A+B) binden als Multiadhäsionsproteine an die extrazelluläre Matrix im eukaryotischen Gewebe (z.B. an verletztem Gewebe, Thromben oder Koagula) und ermöglichen so die Anheftung, Metastasierung und Kolonisierung an verschiedenen Orten im Organismus. Ein weiteres zellwandassoziiertes Protein, das Kollagen-bindende Protein, bindet direkt an das Hauptstrukturprotein Kollagen und ist somit z. B. direkt durch die Adhäsion der Bakterien am Gelenkknorpel am Krankheitsbild von bakteriellen Arthritiden und Osteomyelitiden beteiligt.

Der "Clumping Faktor" bewirkt unter Beteiligung der mikrobiellen Plasmakoagulase die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen. Durch eine Aktivierung von Thrombozyten führt dieses Protein zusätzlich zur Aktivierung der Gerinnungskaskade [67].

Die Plasmakoagulase bindet im Serum an Prothrombin und bildet typische Staphylothrombinkomplexe aus. Durch eine Aktivierung von Fibrin aus Fibrinogen unterstützt es zusätzlich die Oberflächenanheftung [68].

Als weitere Virulenzfaktoren fungieren Elastin-bindende Proteine. Sie binden an Bestandteile der extrazellulären Matrix (Elastin) und dienen somit zur Anheftung an das elastische Körpergewebe. Zur Aktivierung einer Serin-Protease sowie zur Fibrinolyse ist die Staphylokinase befähigt [69]. Dieses extrazelluläre Protein erhöht somit das invasive Potential der Erreger. Die oberflächengebundene Kapsel von Staphylokokken schützt den Mikroorganismus vor Abwehr durch das Immunsystem des Wirts und beteiligt sich zusätzlich an der Ausbildung von Biofilmen [70]. Die DNase führt zur Degradation von Wirtsnukleinsäuren und erleichtert die Erregerausbreitung im Gewebe.

Verschiedene Enzyme und Toxine bilden die Gruppe der extrazellulären Toxine. Als sekretorische Proteine mit hämolysierender Wirkung sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Toxin bekannt.  $\alpha$ -Toxine bewirken eine Porenbildung in der Membran von Körperzellen, aktivieren Zytokine und können zur Koagulation führen. Damit haben sie eine direkte endothelzellschädigende Wirkung und verursachen dermatonekrotische Prozesse und intravasale Koagulation. Das  $\beta$ -Toxin hat Sphingomyelinaseaktivität und hydrolisiert Sphingomyelin, einen wichtigen Lipidbestandteil eukaryontischer Zellmembranen. Auf diese Weise ist es möglich, Erythrozyten und Monozyten zu lysieren. Daraus resultierend entstehen hämorrhagische

Organveränderungen, sklerale Ödeme und Hämolyse. Die exfoliativen Toxine (Proteasen) kodiert durch *eta*, *etb*, *etc*, *etd* werden von etwa 5% aller *S. aureus* Stämme gebildet und verursachen eine bullöse Abhebung der Haut zwischen dem *Stratum spinosum* und dem *Stratum granulosum*. Sie können das Krankheitsbild *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome* (SSSS) hervorrufen [45].

Zwei weitere Zytotoxine sind der Panton-Valentine Leukozidin-Faktor (PVL) sowie das  $\gamma$ -Toxin. Beide können zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen führen [71]. Sie sind zur Bildung von Membranporen in Zellen befähigt und wirken so dosisabhängig zytotoxisch. Neben seiner leukozytolytischen Aktivität lysiert  $\gamma$ -Toxin auch Erythrozyten. PVL zerstört polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen. Es kann zur Dermatonekrose führen und ist oftmals assoziiert mit nekrotisierenden Pneumonien oder tiefgehenden Weichteilinfektionen [72];[71]. Ein weiteres wichtiges Toxin ist das Toxische Schock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1), welches zum gleichnamigen Krankheitsbild des toxischen Schocksyndroms führt. Zusammen mit verschiedenen Enterotoxinen (SEA-SEE, sowie SEG-SEQ) hat es eine superantigene Wirkung und verursacht eine starke T-Zell-Aktivierung durch die Bindung an MHC II [73]. Dadurch kann es zu Symptomen wie Immunsuppression, endotoxischer Schock, Emesis oder Lebensmittelvergiftung kommen [74].

### **2.3. Resistenzentwicklung**

Unter dem Begriff Antibiotika-Resistenz werden Eigenschaften von Mikroorganismen zusammengefasst, die es ihnen ermöglichen, die Wirkung von antibiotisch aktiven Substanzen abzuschwächen oder zu neutralisieren. Dabei treten Resistenzen gegen Antibiotika meist als Anpassung an extreme Umweltbedingungen auf. Unter Antibiotikatherapie entsteht nicht nur ein Selektionsdruck für die pathogenen Erreger, sondern auch für die Normalflora. Die Ursache von Resistenzen können zum einen Mutationen oder die Aufnahme von genetischem Material sein [75]; [76]. Der Resistenzmechanismus hängt von der Wirkungsweise und dem eingesetzten Antibiotikum ab. *S. aureus* weist oftmals Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotikaklassen auf.

### 2.3.1. $\beta$ -Laktam-Antibiotika

Bereits 1942 traten erste Penicillin-resistente *S. aureus* Stämme in Krankenhäusern auf. Diese Penicillin-Resistenz resultiert aus der Aufnahme eines Plasmids, welches u. a. eine Penicillinase (*blaZ*) (ein Penicillin-hydrolysierende Enzym), kodiert. Eine weitere  $\beta$ -Laktam-Resistenz wird durch ein modifiziertes Penicillin-bindendes Protein (PBP2a) ermöglicht, welches durch *mecA* kodiert wird. Nach neuesten Untersuchungen müssen die Transglycosylaseeinheit eines nativen PBP2 und die Transpeptidaseeinheit des PBP2a zusammen fungieren, um die Zellwandsynthese auch in Gegenwart eines  $\beta$ -Laktam-Antibiotikums aufrecht zu erhalten [77]. Auf diese Weise wird die sonst letale Wirkung der  $\beta$ -Laktame auf die Zellwandsynthese einer wachsenden Bakterienzelle neutralisiert. Das *mecA*-Gen befindet sich in der Regel auf einem mobilen genetischen Element namens "Staphylococcal Cassette Chromosome"*mec* (SCC*mec*) und besteht aus dem *mec* Komplex, dem *ccr*-Gen Komplex und mehreren Zwischenregionen, den sog. „junkyard“ Regionen [78]. Man nimmt an, dass *S. aureus* möglicherweise SCC*mec* von KNS (Koagulase-negativen Staphylokokken), z. B. von *S. sciuri*, übernommen hat, da in dieser Spezies ein PBP gefunden wurde, das 87,8% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zu PBP2a besitzt [3]; [79]. Andere Autoren beschreiben einen klinischen Fall, in dem davon ausgegangen wird, dass das *mecA*-Gen von einem *S. epidermidis*-Stamm durch horizontalen Gentransfer *in vivo* an einen MSSA weitergegeben wurde [80].

### 2.3.2. Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika

Da MRSA des CC398 z. T. Resistenzen gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Antibiotika-Gruppen aufweisen können, werden im folgenden Abschnitt Antiinfektiva vorgestellt, die chemisch nicht den  $\beta$ -Laktamring beinhalten. Die möglichen Resistenzmechanismen gegen die jeweiligen Antibiotika werden anhand der Tabelle 1 erläutert. Die Resistenzschemata der einzelnen *S. aureus* ST398-Isolate variieren sehr stark. Dabei findet man MSSA, die überhaupt keine Resistenz gegen ein Antibiotikum zeigen, aber auch MRSA-Isolate, die eine Vielzahl von Antibiotika-Resistenzen aufweisen [18]; [173]. Besonderes Augenmerk liegt in der Veterinärmedizin dabei auf den häufig verwendeten Stoffgruppen wie Tetrazyklinen, Sulfonamiden oder Makroliden.



	Synthese (DHPS); Folsäuresynthese blockiert  wirken bakteriostatisch		2. erhöhte bakterielle Synthese von Aminobenzoessäure als kompetitiver Antagonist der Sulfonamide	
Trimethoprim	Reduktion von Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure wird verhindert durch Bindung an Dihydrofolsäure- Reduktase (DHFR) wirkt bakteriostatisch Sequenzialeffekt mit Sulfonamiden möglich, dann auch bakterizid wirksam	<i>dfrA</i> (Plasmid)  <i>dfrB</i> (chromo- somal)	1. Dihydrofolsäure-Reduktase (DHFR) wird verändert; Wirkstoff kann schlechter binden  2. Reduktion der Affinität von Trimethoprim für die DHFR	[88]
Chinolone	letalen DNA- Doppelstrangbrüchen der bakteriellen DNA- Topoisomerasen (DNA Gyrase, Topoisomerase IV)  wirken bakterizid	<i>gyrA, gyrB</i> (chromo- somal) <i>grlA, grlB</i> (chromo- somal) <i>norA</i> (chromo- somal)	1. Mutation der Gyrase bzw. der Topoisomerase IV; heruntergesetzte Affinität der Wirkstoffe  2. Protonengradienten- abhängige Effluxpumpe	[86]  [89]
Glycopeptide	Verhinderung der Quervernetzung der Peptidoglykanstränge somit Beeinträchtigung der Permeabilität der Bakterien-Zellmembran und der RNA-Synthese  wirken bakterizid	<i>vanA</i> (Plasmid)	Expression einer veränderten Ligase; Zieltarget der antibiotischen Substanz wird verändert	[88]
Fusidinsäure	durch Hemmung des Enzyms Translokase wird die Proteinsynthese am bakteriellen Ribosom verhindert wirkt bakteriostatisch	<i>far1</i> (Plasmid)	Modifikation der Ribosomen	[90] [91]

## 2.4. Molekulare Typisierung

### 2.4.1. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Klassische Methoden der Phänotypisierung können klonale Zusammenhänge zwischen Isolaten nicht aufklären, weshalb verschiedene molekulare Methoden etabliert wurden, die im Folgenden beschrieben werden.

Die Methode der Makrorestriktion mit anschließender Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) bietet die Möglichkeit, durch den Einsatz selten schneidender Endonukleasen die chromosomale DNA von Bakterien vergleichend zu typisieren. Sie ist eine der diskriminativsten Methoden, um nosokomiale Ausbrüche und eventuelle Transmissionsgeschehen zu untersuchen [79]. Lange galt die Banden-basierte PFGE (verwendete Endonuklease: *Sma*I) als Goldstandard zur Typisierung von MRSA-Isolaten. Moleküle bis zu 20.000 Kilobasen können in der PFGE getrennt werden. In einem gepulsten elektrischen Feld werden dabei die 15 bis 17 DNA-Fragmente (nach Makrorestriktion der DNA) mit einer Größe von 10 – 700 kBp isoliert dargestellt. Die elektrophoretische Mobilität eines Moleküls hängt in erster Linie von dessen Ladungszustand ab. Der Ladungszustand wiederum wird vom pH-Wert der Substanz, dem Umgebungs-pH-Wert (Puffer), der Art und Konzentration der Puffer-Ionen und der Temperatur beeinflusst. Wenn Molekül- und Gelporendurchmesser die gleiche Größenordnung haben, werden bei der Wanderung zusätzlich die unterschiedlich großen Moleküle verschieden starken Reibungseinflüssen ausgesetzt, so dass kleinere Moleküle im halbfesten Medium des PFGE-Gels schneller wandern als große [92].

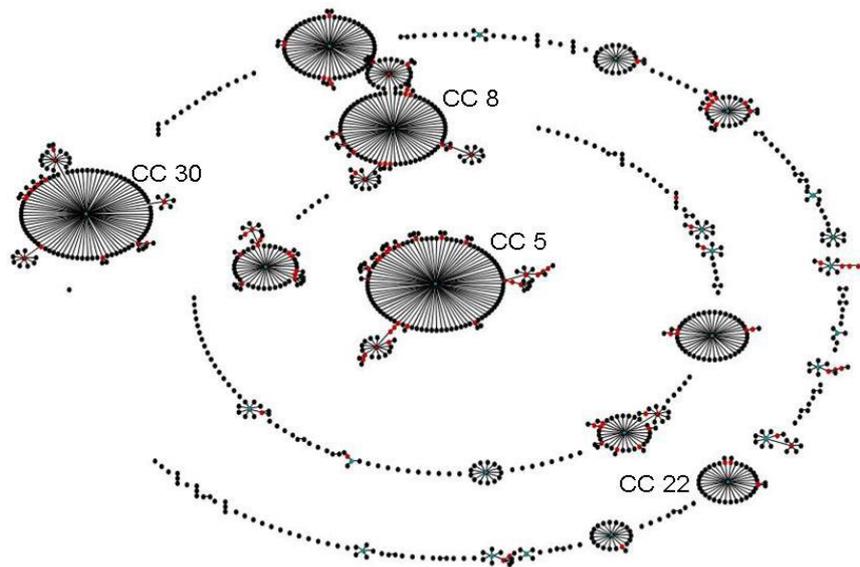
Mittels Färbung mit Ethidiumbromid können die spezifischen Bandenmuster („genetischer Fingerabdruck“) der DNA im Gel sichtbar gemacht werden. Vergleicht man anschließend Restriktionsmuster verschiedener Isolate, welche z.B. einen zeitlichen bzw. räumlichen Zusammenhang aufweisen, kann man gegebenenfalls epidemiologische Aussagen treffen und mögliche Ausbruchssituationen besser einschätzen. In den letzten Jahren fanden Versuche statt, die PFGE zu standardisieren, so dass ein Ergebnisvergleich von Bandenmustern verschiedener Labore oder Institutionen vorgenommen werden kann [93]; [94].

Im Falle aller *S. aureus*-Isolate des klonalen Komplexes 398 ist eine Typisierung mittels *Sma*I nicht möglich. Durch eine Methylierung der Basen in der Enzymzielsequenz können auf diesem Wege keine Fragmente gewonnen werden. Es stellte sich aber heraus, dass die Möglichkeit besteht, Isoschizomere von *Sma*I wie zum Beispiel *Cfr*9I oder *Xma*I zu diesem Zweck zu nutzen. Protokolle zur Durchführung wurden mittlerweile optimiert und ergeben Bandenmuster, die qualitativ vergleichbar sind mit Mustern von *S. aureus*-Stämmen, die durch *Sma*I-Verdau gewonnen werden [95].

## 2.4.2. Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Die Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST) ist eine sequenzbasierte molekulare Typisierungsmethode, die zur Untersuchung der klonalen Evolution von *S. aureus* dient. Ursprünglich wurde die MLST für *Neisseria meningitidis* entwickelt und später in ähnlicher Weise für *S. aureus* etabliert [96]. Dabei werden Polymorphismen innerhalb von ca. 0,5kb großen Fragmenten von 7 speziellen Haushaltsgenen bestimmt. Haushaltsgene sind besonders hoch konserviert und stehen kaum unter Selektionsdruck. Durch die Analyse von multiplen genetischen Targets, die weit über das gesamte Genom verteilt sind, wird der eventuelle Effekt von Rekombinationen minimiert. Die Methode stellt eine gute Möglichkeit zur Erforschung der klonalen Evolution von MRSA dar und dient außerdem zum eindeutigen Speziesnachweis. Jeder Sequenztyp (ST) wird durch ein spezifisches Allelprofil definiert. Ein definierter Abschnitt von jedem der 7 Haushaltsgene, welche für *S. aureus* ausgewählt wurden (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*), wird hierfür sequenziert. Jeder Variante in der Basensequenz ist ein bestimmter Alleltyp (bezeichnet durch arabische Ziffern) zugeordnet. Das Allelprofil aller sieben Gene bestimmt in der Folge den Sequenztyp. Das Allelprofil für Isolate des ST398 setzt sich wie folgt zusammen: 3, 35, 19, 2, 20, 26, 39. Mit Hilfe von bereits hinterlegten Sequenzen bzw. Alleltypen in einer Online-Datenbank ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)) ist ein ortsunabhängiger Abgleich jederzeit möglich. Isolate, die in einem oder zwei *loci* im Allelprofil abweichen, nennt man *single locus variants* (SLV) bzw. *double locus variants* (DLV). Isolate mit demselben ST ebenso wie SLVs und DLVs werden als Angehörige eines klonalen Komplexes angesehen [25], [97]. Mittels *Based Upon Related Sequence Types* (BURST)-Analyse ist die Einteilung dieser STs, SLVs und DLVs in klonale Komplexe (CC) und die Analyse von evolutionären Ereignissen möglich. Ein eBURST-Diagramm für *S. aureus* (<http://eburst.mlst.net/>) ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abb. 1: Verwandtschaftliche Beziehungen der klonalen Komplexe von *S. aureus*



Die Abbildung zeigt ein eBURST- Diagramm für *S.aureus*. Blaue Punkte repräsentieren Gründer der jeweiligen klonalen Komplexe, rote und schwarze Punkte stellen SLVs und DLVs dar.

### 2.4.3. *spa* Typisierung

*S. aureus* Stämme bilden als Bestandteil ihrer Zellwand das Protein A aus. Das für dieses Protein kodierende Gen *spa* besitzt eine Länge von ca. 2150 bp. Es besteht aus drei verschiedenen Regionen, der Fc-Region (bindet das Fc- Stück von Immunglobulin G), der hypervariablen Region X und dem C-Terminus. Zur molekularen Typisierung nutzt man die DNA-Sequenzierung der variablen Region X, welche aus kurzen Sequenz-Wiederholungen (engl.: *repeats*) aufgebaut ist. Innerhalb dieser zwischen 21 und 27 bp langen repeats kann es zu Punktmutationen kommen (z.B. CCC → CCA). Außerdem können ganze repeats verdoppelt oder entfernt (*slipped-strand mispairing*) werden. Die Art und Abfolge dieser repeats dient zur Charakterisierung einzelner Isolate und zur Bestimmung ihres *spa*-Typs. Der große Vorteil gegenüber der MLST-Analyse ist die Einfachheit der Methode. Man muss nur einen Locus sequenzieren und kann schnell und kostengünstig arbeiten [98]. *S. aureus* weist eine hohe Stabilität der *spa*-Typen auf und die repeat-Region kann zuverlässig amplifiziert werden. Die diskriminatorische Fähigkeit dieser Methode liegt zwischen der von PFGE und MLST [99]. Mehrere *spa*-Typen können innerhalb eines STs auftreten [50]; [100]. Alle bisher identifizierten *spa*-Typen werden in einer Datenbank abgelegt und gespeichert ([www.ridom.de/spaserver/](http://www.ridom.de/spaserver/)) ([101]).

#### **2.4.4. SCCmec-Typisierung**

Wie schon vorher beschrieben, ist die „*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*“ (SCCmec) ein potentiell mobiles Element, welches in der DNA von Staphylokokken an einer bestimmten Stelle im Genom auftreten kann. MRSA entstehen durch Aufnahme dieses Fragments, welches u.a. aus *mecA*, *ccr*-Komplex und verschiedenen Junkyard Regionen besteht, aus MSSA. SCCmec wird in ISS (engl. *integration site sequence for SCC*) am 3'Ende des *orfX* in das Genom von *S. aureus* integriert. Momentan geht man von 11 verschiedenen SCCmec-Typen aus [102]; [103] [104]; [105]; [106]; [107]; [108]. Die Nomenklatur befindet sich allerdings im Wandel. Die Variation verschiedener Bestandteile von SCCmec kann zur Etablierung neuer Typen führen. Außerdem gibt es SCCmec, die mit den derzeit vorhandenen Methoden nicht typisierbar sind.

Das Zusammenspiel von unterschiedlichen Regulatorgenen und *ccr*-Komplexen sowie der J-Regionen bestimmt das jeweilige SCCmec-Element. Die Unterscheidung der jeweiligen Elemente gibt wichtige Hinweise zur Verfolgung von Evolutionsprozessen und der Verbreitung bestimmter epidemiologischer MRSA.

#### **2.4.5. Denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC)**

Eine der sensitivsten und dazu noch sehr akkurate Methode zur Detektion von genetischen Veränderungen und SNPs stellt die dHPLC-Methode (*denaturing high performance liquid chromatography*) dar. Diese wurde erstmals 1995 von OEFNER und UNDERHILL beschrieben und basiert auf der Trennung von Heteroduplex- von Homoduplexformationen in PCR-Produkten zweier chromosomaler Fragmente [109]. Die untersuchten Genloci sind hochkonservierte Gene, die an verschiedenen Stellen des *S. aureus* Genoms liegen [110]. Der Genotyp eines Organismus repräsentiert sein Erbgut, also die Gesamtheit der genetischen Information in Form eines individuellen Satzes von Genen. Daraus folgt, dass zwei Organismen, deren Gene sich auch nur an einem Locus unterscheiden, einen unterschiedlichen Genotyp besitzen [111]. Als Haplotyp wird im Allgemeinen eine Variante einer Nukleotidsequenz auf ein und demselben Chromosom im Genom eines Lebewesens bezeichnet [112]. Zur Bestimmung der Haplotypen einer Population haploider Individuen wie z. B. Bakterien derselben Spezies ist es möglich, durch Sequenzierung SNPs zu bestimmen und die so bestimmten Allelvarianten der gegebenen Population zu nutzen. Der Haplotyp eines Individuums beschreibt dabei spezifische Kombinationen der Sequenzvarianten, die durch die Abfolge mehrerer SNP-Loci entlang eines einzelnen Gens definiert sind.

Durch Denaturierungs- und Renaturierungsschritte werden bei der dHPLC-Methode Doppelstrangfragmente der DNA von zwei oder mehreren Individuen aufgespalten und

wieder zusammengefügt. Trägt eines der beiden Fragmente eine Mutation, d. h. weichen die Sequenzen an einer bestimmten Stelle voneinander ab, bilden sich Heteroduplices. In gleicher Weise entstehen Homoduplices, bei welchen die gegenüberliegenden Basen komplementär sind. Heteroduplices tragen also Basen-Mismatches, sind dadurch weniger thermostabil und besitzen veränderte physikalische Eigenschaften. Mit Hilfe einer hochauflösenden Polymermatrix können die unterschiedlich stark negativ geladenen Heteroduplices und Homoduplices getrennt werden. Dies geschieht mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie. Dabei hat sich eine aus alkylierten, hydrophoben Polystyren-Divinylbenzol-Partikeln bestehende Säule als stationäre Phase durchgesetzt. Das amphiphile Molekül TEAA (Triethylammoniumacetat) übernimmt zwischen der stationären und der mobilen Phase eine Brückenfunktion. Hydrophobe Alkylketten binden an die Chromatographiesäule. Somit ist es möglich, dass die Ammonium-Kationen des TEAA-Moleküls ein positives Oberflächenpotential generieren. Anschließend wird über elektrostatische Wechselwirkungen der mehr oder weniger stark negativ geladenen Phosphatgruppen der gelösten DNA-Moleküle die Bindung an die Säule realisiert. Anschließend können kontinuierlich steigende Acetonitrilkonzentrationen diese Bindungen zwischen der hydrophoben Säule und den Alkylketten des TEAA lösen und eluieren die verschiedenen Fraktionen der DNA-Fragmente so von der Säule. Die Heteroduplices eluieren dabei schneller als die Homoduplices. Die ausgewaschenen DNA-Fragmente können mittels UV-Detektor photometrisch erfasst werden. Es entstehen Chromatogramme, die anschließend mit speziellen PC-Programmen (z. B. Navigator<sup>TM</sup> Software, Transgenomic Inc.) ausgewertet werden können.

Die detektierten Fragmente werden dabei in elektrische Signale umgewandelt und erscheinen visuell als Peaks. Mindestens ein Peak erscheint für alle Fragmente. Kommt es zur Erscheinung weiterer Peaks oder sogenannter „Schultern“ bzw. Doppelpeaks beim Übereinanderlegen verschiedener Isolate, kann man davon ausgehen, dass eine Abweichung in der Genstruktur eines einzelnen Isolates vorliegt. Dieses Fragment wird im Anschluss sequenziert

## 2.5. Populationsstruktur und klonale Verbreitung von MRSA

### 2.5.1. Populationsstruktur

In den zurückliegenden Jahren hat sich die Epidemiologie von MRSA stark verändert. Wurden sie noch vor ein paar Jahren als traditioneller nosokomialer Erreger angesehen, findet man Infektionen mit MRSA mittlerweile auch bei Personen ohne spezifische Risikofaktoren. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts traten dann auch MRSA bei Nutztieren auf, von denen ebenfalls eine Gefahr der Besiedlung und/ oder Infektion für den Menschen ausgehen kann. Die Verbreitung von MRSA erfolgt vorwiegend klonal. Klone sind genetisch gleiche Zellen, die alle von einer Ursprungszelle abstammen. Die Vermehrung der Bakterien erfolgt asexuell durch Zellteilung. Alle Nachkommen weisen dadurch ein identisches Genom auf und sind somit ein Klon der Mutterzelle. Die Aufnahme von Genmaterial kann dann zusätzlich durch beispielsweise horizontalen Gentransfer erfolgen. Es entstehen so immer wieder Tochterzellen, die genomisch nicht mehr vollkommen identisch zum Ursprungsbakterium sind, aber trotzdem verwandtschaftliche Beziehungen zu ihren Vorgängern haben und als Nachfahren (*related genotypes*) bezeichnet werden. Untersuchungen von *Enright et.al* zur Populationsstruktur von MRSA-Isolaten mittels MLST-Analyse zeigen, dass ein Großteil der MRSA weltweit klonalen Gruppen angehören [50]. Einzelne spezielle Linien treten gehäuft auf und dominieren die Populationsstruktur. Sie werden als Epidemiestämme bezeichnet und sind über weite Regionen verbreitet. Dabei kommen einige Stämme weltweit, andere jedoch hauptsächlich in Europa oder den USA vor. Einer der ersten isolierten MRSA-Stämme, der sogenannte archaische Klon, besaß ein *SCCmec*-Element der Gruppe I und verbreitete sich in den 1960er Jahren zunächst europaweit und wenig später auch auf der ganzen Welt [79]. 1982 wurde in Japan ein MRSA-Stamm entdeckt, der ein *SCCmec* Element der Gruppe II besaß und sich ebenfalls über die gesamte Welt als sogenannter „New York/Japan“-Stamm verbreitete. Heute geht man davon aus, dass die Entstehung von MRSA durch die Aufnahme von unterschiedlichen *SCCmec*-Elementen in verschiedenen Linien von *S. aureus* stattgefunden hat [50]; [113]; [110].

Die Populationsstruktur von MRSA lässt sich auf eine relativ überschaubare Anzahl klonaler Hauptlinien zurückführen. Mittels MLST-Analyse können weltweit identische Sequenztypen bestimmt werden [96]. All diese MRSA-ST's gehören lediglich fünf verschiedenen klonalen Komplexen an (s. Tabelle 2) [79].

Tab. 2: Überblick über die „Hauptklone“ der Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA)

<b>Stamm</b>	<b>MLST Profil</b>	<b>ST</b>	<b>CC</b>	<b>SCCmec</b>	<b>spa-Typ</b>
Archaischer Klon	3-3-1-1-4-4-16	250	8	I	t008, t009, t194
Süddeutscher Klon	1-4-1-4-12-24-29	228	5	I	t001, t023, t041, t188, t201
Iberischer Klon	3-3-1-12-4-4-16	247	8	I	t008, t051, t052, t054, t200
Brasilianischer Klon	2-3-1-1-4-4-3	239	8	III	t030, t037, t234, t387, t388
Berlin Klon	10-14-8-6-10-3-2	45	45	IV	t004, t015, t026, t031, t038, t050, t065, t204, t230, t390
New York/ Japan Klon	1-4-1-4-12-1-10	5	5	II	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443
UK EMRSA-2/-6	3-3-1-1-4-4-3	8	8	IV	t008, t024, t064, t190, t206, t211

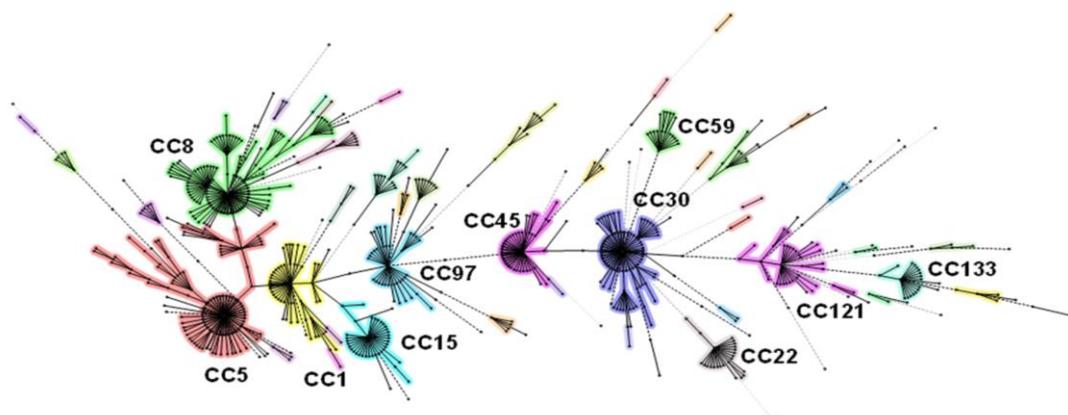
Die Tabelle gibt einen Überblick über die wichtigsten klonalen Komplexe und Sequenztypen der Methicillin-resistenten *S.aureus* (MRSA) [79]. Sie hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Ein ST8-MSSA (CC8) soll der Vorgänger des ersten isolierten MRSA Stammes (ST250-MRSA-I) sein [79]. ST250 unterscheidet sich von ST8 in einer Punktmutation des *ygiL*-Gens (MLST-Locus). Klone von ST8-MSSA sind epidemische MSSA-Stämme und acquirierten über die Jahre SCC*mec* Elemente der Gruppen I, II und IV (UK EMRSA-2/-6).

Sehr enge verwandtschaftliche Beziehungen bestehen zwischen ST250 und ST247. Der sogenannte „iberische Klon“ ST247-MRSA-I ist einer der Hauptverursacher von MRSA-Infektionen in europäischen Krankenhäusern und weicht in einer Punktmutation im *gmk*-Locus von ST250 ab.

Als „brasilianischer Klon“ werden ST239-MRSA-III-Stämme bezeichnet. Dieser Klon entwickelte sich durch homologe Rekombination, wobei vermutlich ein 557 kb großes Fragment von ST30 in ST8-MRSA-III transferiert wurde [114]. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die klonalen Komplexe CC5, 22 und 45 von ST8 in sechs oder sieben MLST-Loci. Man nimmt an, dass sie aus MSSA-Linien durch Acquirierung von verschiedenen SCC*mec*-Elementen hervorgegangen sind. Eine Studie von *Robinson et al.* zeigt, dass die Aufnahme von SCC*mec* in *S. aureus* viermal häufiger vorkommt als der Austausch eines SCC*mec*-Elementes gegen ein anderes [115]. Vor allem SCC*mec* IV wurden in Einzelstudien doppelt so häufig gefunden wie andere Elemente. Das könnte damit zusammenhängen, dass diese Elemente kleiner sind als andere und somit die Aufnahme oder der Austausch zwischen Staphylokokken erleichtert wird [100]. Die verwandtschaftlichen Beziehungen der wichtigsten definierten klonalen Komplexe, basierend auf konkatenierten MLST-Daten, sind anhand eines *Minimum Spanning Trees* in der Abbildung 2 veranschaulicht. Alle Daten sind über [www.mlst.net](http://www.mlst.net) verfügbar.

Abb. 2: Populationsstruktur von *S. aureus* basierend auf MLST Sequenzdaten, graphisch dargestellt sind die verwandtschaftlichen Beziehungen der klonalen Komplexe (CC) von *S. aureus*



CA-MRSA werden ebenfalls in klonale Linien eingeteilt. Sie unterscheiden sich sowohl phänotypisch als auch genotypisch von den HA-MRSA [79]. Erstmals wurden CA-MRSA 1993 in West-Australien von Patienten ohne erkennbare Risikofaktoren für eine MRSA-Kolonisation gefunden [52]. PFGE-Analysen zeigten, dass CA-MRSA zu anderen klonalen Linien gehören als die bekannten HA-MRSA. Außerdem konnte eine größere klonale Diversität für letztere Gruppe nachgewiesen werden [79]; [98]. Weltweit gesehen unterscheiden sich CA-MRSA in ihren SCC<sub>mec</sub>-Typen, PFGE-Mustern sowie ihren MLST- und *spa*-Profilen. Betrachtet man die Verteilung und das Vorkommen von MRSA international, so fallen vor allem die unterschiedlichen MRSA-Prävalenzen der einzelnen Länder auf. Findet man in nordischen Ländern wie Schweden oder Norwegen MRSA-Prävalenzen von weniger als 1% und in Dänemark oder den Niederlanden jeweils 5%, sind es im mitteleuropäischen Raum wie Deutschland ca. 16% (Daten des BfR, „European Antimicrobial Resistance Surveillance System“ EARS-Net, 2011). Erschreckend hoch ist die Prävalenz in verschiedenen anderen Ländern wie z. B. Griechenland oder dem Vereinigten Königreich, wo in Krankenhäusern bis zu 40% MRSA nachgewiesen werden können (EARS-Net). Die Ausbildung eines starken Nord-Süd-Gefälles der Prävalenzen kommt hier unter anderem durch die betriebene „*search and destroy*“-Politik der nordischen Länder zustande [116]. Weltweit betrachtet haben auch Länder wie die USA oder Japan mit Prävalenzen von 30- 70%, Probleme diese oftmals multiresistenten Erreger unter Kontrolle zu bringen. In Deutschland herrschen momentan verschiedene HA-MRSA Stämme vor, beispielsweise ST22 (CC22), ST225 (CC5), ST45 (CC 45), ST 247 (CC8), ST 239 (CC8) oder ST 228 (CC 5) (Daten des RKI, Epidemiologisches Bulletin 21/2013). Der sogenannte „Barnim-Epidemiestamm“ ST22 ist in Deutschland am häufigsten vertreten und tritt in Krankenhäusern bundesweit auf [117]. Zweithäufigster Epidemiestamm in der Bundesrepublik ist ST5/ST225 (CC5: „Rhein-Hessen“-Epidemiestamm), welcher früher vor allem im Westen und Südwesten der BRD isoliert wurde, heute aber bereits in ganz Deutschland nachgewiesen worden ist. Auch die Häufigkeit der Verbreitung des überwiegend im Norden Deutschlands und in Nordrhein-Westfalen auftretenden ST45 („Berliner“-Epidemiestamm) steigt zunehmend (Daten des RKI, Epidemiologisches Bulletin 21 / 2013).

Im Gegensatz zu den HA-MRSA ist die Prävalenz von CA-MRSA derzeit noch niedrig, ist in den letzten Jahren jedoch stetig angestiegen [98]. In der Gruppe der CA-MRSA findet man in Australien und Südamerika vorwiegend Isolate des ST30 [118]. ST80 tritt häufig bei Isolation europäischer Stämme und in Isolaten des mittleren Ostens auf [119]; [53]. In den USA gibt es Berichte über Isolate, die zu den Sequenztypen ST1, ST8 und ST59 gehören [118]; [120]. In Deutschland sind vermehrt die klonalen Linien ST8 („USA300“) und ST80 verbreitet [90]; [16]; [53]. Der ursprünglich aus den USA stammende und dort häufig auftretende Stamm

„USA300“ wird in den letzten Jahren zunehmend im gesamten deutschen Bundesgebiet beobachtet und führte zu schweren Haut-Weichgewebe-Infektionen [121]. Im Gegensatz dazu nimmt die Bedeutung des ST80, der ursprünglich in Europa am weitesten verbreitete CA-MRSA, in Deutschland derzeit ab. Nachweise der klonalen Linien ST22 und ST5 gibt es immer wieder über den gesamten deutschen Raum verteilt (Daten des RKI, Epidemiologisches Bulletin 21/2013). In den letzten Jahren identifizierte man Risikofaktoren für eine Kolonisierung bzw. Infektion mit CA-MRSA. Zu ihnen zählen gastrointestinale Erkrankungen; intravenöser Drogenmissbrauch; direkter Kontakt zu Personen, die an einer durch CA-MRSA assoziierten Hautkrankheit leiden; indirekter Kontakt mit kontaminierten Objekten oder Geräten wie Handtüchern, Sportgeräten oder Seifenspendern in Sportstätten oder Gefängnissen sowie sehr enger Kontakt zwischen militärischen Angestellten [79].

### **2.5.2. Klonale Verbreitung von MSSA und MRSA in der Tiermedizin**

Lange Zeit wurden MRSA stets mit einem nosokomialen Hintergrund in Verbindung gebracht. Das Auftreten von in der „community“ verbreiteten MRSA (CA-MRSA) konnte erst später beobachtet werden. In der Tierhaltung spielten MRSA zunächst keine Rolle. Dies änderte sich, als 1972 erstmals MRSA bei an Mastitis erkrankten Rindern isoliert wurde [4]. Heute stellen MRSA nicht nur in der Human-, sondern auch in der Veterinärmedizin ein infektionsmedizinisches Problem dar. *S. aureus* ist einer der wichtigsten opportunistischen Infektionserreger bei zahlreichen Tierarten und verursacht Erkrankungen wie postoperative Wundinfektionen, pyogene Infektionen, Mastitiden oder Septitiden. Im Gegensatz zu MRSA sind MSSA bei Nutztieren bisher eher weniger gut erforscht. Zur Abklärung des Vorkommens auftretender MSSA-Genotypen bei Tieren gibt es derzeit kaum Forschungsarbeiten. Vor initialen Einzelberichten über MRSA-Infektionen mit Stämmen des CC398 bei Menschen zu Beginn des 21. Jahrhunderts war dieser Sequenztyp völlig unbekannt [122]; [17]. Im Jahre 2005 wurde man durch ein schweres Infektionsgeschehen bei einem Kind aus einer Landwirtfamilie auf eine mögliche Quelle für diesen Erreger aufmerksam [24]; [123]. Untersuchungen im Umfeld des Kindes sowie Proben von klinisch gesunden Schweinen des Hofes erbrachten vermehrt positive Nachweise für MRSA des CC398. Bei darauffolgenden groß angelegten Untersuchungen in Schlachthöfen fanden Wissenschaftler ebenfalls diesen bis dato bei Tieren nicht beschriebenen MRSA-Sequenztyp (ST398) in nasalen Tupferproben von Schlachtschweinen [13]. Weitere Studien zeigten, dass die Prävalenz von CC398-Isolaten in niederländischen Schweinebeständen extrem hoch war, und das Interesse an diesem Sequenztyp wuchs. Durchgeführte Untersuchungen bewiesen das erhöhte Besiedlungsrisiko für Menschen, die in der Tierproduktion tätig sind oder die häufig direkten Kontakt zu diesen Tieren haben [21]; [22].

## MSSA und MRSA bei Pferden

Bei Pferden verursacht *S.aureus* meist eitrige Wund- und Hautinfektionen, aber auch Pneumonien, Endokarditis, Botryomykose, Mastitis oder Sepsis. Über das Auftreten von MRSA bei Pferden berichtete 2000 eine Zuchtstutenstudie, bei der aus Nasentupfern in 13% aller untersuchten Isolate MRSA nachgewiesen wurden [124]. Infektionscluster mit MRSA in Tierkliniken wurden erstmals in einer kanadischen Einrichtung und kurze Zeit später auch aus einer deutschen Tierklinik bekannt [125]; [126]. In beiden Studien gehörten die Isolate dem ST8 bzw. dem ST254 (CC8) an. In einer Pferdeklinik in Österreich wurden aus Infektionen oder nasaler Besiedlung von Pferden vorwiegend Stämme des ST1 (CC8), ST254 (CC8) und ST398 (CC398) isoliert [28]. Einen Überblick über die bis 2014 bei Pferden isolierten Sequenztypen gibt die Tabelle 3.

Tab. 3: Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei Pferden

<u>Land/Jahr</u>	<u>Sequenztyp/klonaler Komplex</u>	<u>Referenz</u>
Kanada, 2005 England und Irland, 2006 Deutschland, 2006 und 2009	CC8 → Isolate des ST8, ST254	[125] [127] [126]; [65]
Österreich, 2008	ST1, ST254, ST398	[28]
Belgien, 2009	ST398	[128]
Österreich, 2008	ST254	[28]
Deutschland, 2009	ST254, ST8, ST22, ST1117, ST398	[65]
Niederlande, 2010	ST8, ST398	[59]
USA, 2010	ST8	[129]
Spanien, 2005-2011	ST398	[130]
Deutschland, 2010-2012	CC8, CC398, CC5, CC599	[131]
Schweden 2012	CC398	[132]
Belgien, 2013	ST398	[133]
Schweiz, 2013	ST398, ST22, ST254, ST1	[134]
Deutschland, 2014	CC398	[135]

## MSSA und MRSA bei Schweinen

Es gibt nur sehr wenige Berichte über Erkrankungen durch MRSA bei Schweinen. Erstmals wurde 2007 von klinischen Symptomen in Form von exsudativer Dermatitis bei Ferkeln, verursacht durch MRSA, berichtet [136]. Im Gegensatz dazu gab es schon vorher Veröffentlichungen über MSSA-Infektionen bei Schweinen. Im Vordergrund stehen hier Erkrankungen der Haut sowie Wundinfektionen und Mastitiden, aber auch Infektionserkrankungen des Harntrakts und der Knochen sind beschrieben worden [55]; [57]. 2009 veröffentlichten *Pomba et al.* eine Studie, in der MRSA-Isolate aus einem Ausbruch exsudativer Dermatitis auf drei verschiedenen Farmen untersucht wurden. Der dominierende Sequenztyp war hier ST398 [137].

Bei Schweinen sind folgende klonale Komplexe beschrieben: CC5, CC8, CC30, CC97 und CC398 (siehe Tabelle 4). Es gibt Berichte über das Vorhandensein von MSSA und MRSA des ST9 aus China und Deutschland sowie Nachweise des CC30 aus Portugal [138]; [20]; [139]; [140]. In einer kanadischen Studie gehörten 14% der MRSA Isolate dem ST5 („USA100“) und 74% dem ST398 an [141]. Auch typische HA-MRSA wie der ST22 wurden vereinzelt beim Schwein gefunden [142]. Seit 2005 zeigen etliche Untersuchungen, dass der derzeit vorherrschende MRSA-Stamm in Schweinen ST398 zu sein scheint. Studien aus vielen europäischen Ländern sowie Kanada, China, Singapur oder den USA unterstützen diese Vermutung [23]; [143]; [55]; [144]; [56]; [145]; [142]; [146]. Untersuchte Schweine mit positiven nasalen ST398-Nachweisen sind überwiegend gesund und weisen bis auf einige Ausnahmen keinerlei Krankheitserscheinungen auf [136]. Allerdings wiesen *Lin et al.* bei einem Schwein mit Haut- und Weichteilinfektionen einen PVL-positiven MRSA (ST8) nach [129]. Die Tabelle 4 soll einen Überblick über die bisher beim Schwein gefundenen Sequenztypen und klonalen Komplexe geben. Aufgrund der Vielzahl der Berichte über CC398-Funde beim Schwein erhebt sie keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Tab. 4: Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei Schweinen

<u>Land/Jahr</u>	<u>Sequenztyp/klonaler Komplex</u>	<u>Referenz</u>
Frankreich, 1996-2002	ST9, ST398, ST433 (alle MSSA)	[55]
Dänemark, 2007	ST398	[143]
Niederlande, 2007	ST398	[13]
Singapur, 2007	ST22, ST398	[142]
Deutschland, 2007	ST398	[23]
Kanada, 2008	CC5, CC398	[141]
China, 2009	ST9, ST398(MSSA)	[138]
Deutschland, 2009	ST398 ST9, ST398 ST398, ST97, ST9, ST30 (MSSA)	[140], [147] [20] [57]
Portugal, 2009	CC30, CC398	[139], [137]
Malaysia, 2009	ST9	[148]
USA, 2009	ST398	[146]
China, 2009	ST9, ST398	[145]; [149]
Serbien, 2010	ST45	[150]
Spanien, 2010	ST1379 → CC97, CC398	[151]
Italien, 2010	ST1, ST9, ST97, ST398	[152]
Japan, 2010	ST221 → CC5	[153]
USA, 2010	ST8	[129]
Peru, 2011	ST8, ST398	[154]
USA, 2012	ST398, ST5	[155]
Japan, 2012	ST398, ST9	[156]
Taiwan, 2012	ST9	[157]
Irland, 2013	CC5	[158]
Belgien, 2013	CC398	[159], [160]
Litauen, 2013	ST398	[161]
USA, 2013	ST398	[162]

## **MSSA und MRSA bei Wiederkäuern**

Bei Wiederkäuern spielt *S.aureus* eine wichtige Rolle als Mastitiserreger und kann zu schweren ökonomischen Einbußen im Milchgeschäft führen. MRSA bei Kühen sind schon lange bekannt. Erstmals wurde MRSA bei Tieren 1972 im Zuge eines Mastitisgeschehens von Devriese bei Rindern nachgewiesen [4]. Wenig später berichtete Devriese außerdem von 86 bovinen MRSA-Stämmen, bei denen er einen humanen Ursprung vermutete [163]. 2003 beschrieben Lee *et al.* 12 bovine *S. aureus*-Stämme aus Mastitisgeschehen, die identische RAPD-Muster (engl.: *random amplified polymorphic DNA*) zu einigen humanen Stämmen aufwiesen [164]. Die Zuordnung animaler Isolate zu klonalen Komplexen wurde erst in den letzten Jahren vorangetrieben. Eine ungarische Studie z.B. wies 2007 Isolate des ST1 bei Rindern nach [165]. In einer deutschen Studie wurden MRSA-Isolate von irischen und niederländischen Rindern untersucht, die eine Auswahl von 15 verschiedenen Sequenztypen umfasste. Am häufigsten waren Isolate des ST151 und des ST97 vertreten, weitere Sequenztypen sind in der Tabelle 5 aufgelistet [166]. Auch über *S. aureus* des CC398 wird immer wieder bei Wiederkäuern berichtet. Vor allem Saugkälber und Milchrinder mit Mastitisgeschehen sind betroffen [167]; [27]; [168]. Neben Erkrankungen des Euters gibt es zudem viele Rinder, bei denen die symptomlose nasale Besiedlung nachgewiesen werden kann.

Tab. 5: Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei Wiederkäuern

<u>Land/Jahr</u>	<u>Sequenztyp/klonaler Komplex</u>	<u>Referenz</u>
Ungarn, 2007	ST1	[165]
Deutschland, Schweiz 2007	CC1, CC5, CC8, CC20, CC25, CC97, CC133, CC151, CC398	[169]
Deutschland, 2010	ST398	[27]; [170]
Belgien, 2010	CC398 Mastitis	[167]
Deutschland, 2010	ST151, ST97, ST71, ST771, ST504, ST479, ST1, ST9, ST45, ST50, ST115, ST20, ST398, ST389, ST1229, ST1230, ST 1231	[166]
Niederlande, 2010	ST398	[168]
USA, 2011	ST5, ST8, ST398	[171]
England, 2012	CC398	[172]
Belgien, 2012	CC398	[173]
Belgien, 2013	CC130, CC599	[160]
England, 2013	CC5, CC522, CC133, CC700	[174]
Finnland, 2013	ST130, ST375	[175]

### **MSSA und MRSA bei Geflügel**

Auch beim Geflügel stellt *S. aureus* eine mögliche Infektionsursache dar. Oftmals treten schwere Krankheitsbilder auf, welche vor allem in der Broilerindustrie zu ökonomischen Verlusten führen. Das Krankheitsspektrum reicht hier von Dermatitisen zu Ostitiden, Arthritiden und Synovitiden. Häufig kommen auch Toxämien mit Todesfolge beim Geflügel vor. Die nachgewiesenen klonalen Linien von MRSA umfassen bislang nur wenige klonale Komplexe. Eine schottische Studie zeigte, dass die Mehrheit der *S. aureus* Isolate dem CC5 angehörte. Ein kleiner Anteil gehört auch zum CC385, einem vogelspezifischen klonalen Komplex, der bisher nicht bei Säugetieren gefunden wurde [176]. Neben einzelnen Isolaten, die dem ST9 angehören, wurden in den letzten Jahren auch beim Geflügel vermehrt CC398-Isolate nachgewiesen ([26]; [58]). Ebenso kommen MSSA bei Geflügel vor (siehe Tabelle 6) [177].

Tab. 6: Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei Geflügel

<u>Land/Jahr</u>	<u>Sequenztyp/klonaler Komplex</u>	<u>Referenz</u>
Belgien, 2008	CC398	[58]
UK/Schottland, 2009	CC5, CC385	[176]
Belgien, 2009	ST398	[178]
Polen, 2010	CC5, ST398 (MSSA)	[177]
Niederlande, 2010	ST398, ST9	[26]
Belgien, 2011	ST398	[179]
Deutschland, 2012	CC398, CC5, CC9	[180]
Belgien, 2013	CC5, CC101, CC398, CC121	[181]
Deutschland, 2013	CC398	[182]

### **MRSA bei Haus- und Heimtieren**

Im Kleintierbereich zählen *S. aureus* zu den bedeutendsten opportunistischen Infektionserregern, sowohl im Zusammenhang mit Einzeltierkrankungen als auch in Verbindung mit nosokomialen Ausbrüchen in Tierkliniken [63, 65]; [179]; [183]. Kleine Haus- und Heimtiere können selbst infiziert oder als transiente Träger an Transmissionsprozessen beteiligt sein, wobei eine Übertragung sowohl auf andere Tiere als auch auf den Menschen möglich ist [7]. Eine Studie aus Hongkong (2007) zeigte, dass 23,6% der untersuchten Hundebesitzer nasal mit *S. aureus* besiedelt waren und 8,8% ihrer Hunde ebenfalls [184]. Dabei wurden von insgesamt 10 Proben MRSA, darunter sowohl typische HA-MRSA sowie typische CA-MRSA bei Mensch und Hund nachgewiesen. Die Dynamik von Transmissionsprozessen wird durch einen Bericht unterstützt, bei dem ein humaner MRSA-Träger erst nach der gemeinsamen Sanierung von Tier und Mensch einen dauerhaften Therapieerfolg verzeichnen konnte [185]. Auch *Sing et al.* berichteten über einen Fall, bei dem MRSA aus einem tiefen, rezidivierenden Abszess einer Patientin sowie deren Familie und deren Katze isoliert werden konnte. Der Stamm gehört zum Sequenztyp ST80, *spa*-Typ 131, und trägt ein *SCCmec* Element des Typs IV. Erst nachdem die Katze saniert wurde, gelang auch die vollständige Ausheilung der Patientin [186]. Verschiedene deutsche Studien dokumentieren Infektionen mit MRSA in Kleintierkliniken und stellen die direkte Verbindung zum „Barnim-Epidemiestamm“-ST22 her, wobei auch nasal kolonisiertes Personal in die Untersuchung mit einbezogen wurde [10], [187]. Mehrere Studien zu MRSA-Nachweisen aus

postoperativen Wundinfektionen verdeutlichen die Problematik im Kleintierbereich [188]; [126]; [189] . Eine irische Studie aus dem Jahr 2010 erbrachte neben den Nachweisen von CC8- und CC22-Stämmen bei Hunden und Katzen erste Isolate des CC5 bei einem Hund sowie dem betreuenden Veterinärpersonal [190]

Das Vorkommen von PVL-positiven MRSA in mikrobiologischem Untersuchungsmaterial von Hunden, einer Katze, einem Kaninchen sowie einem afrikanischen Graupapagei wurde erstmals 2005 von *Rankin et al.* beschrieben [191]. Seitdem wird sporadisch von Infektionen mit PVL-positiven *S. aureus* Stämmen bei Tieren berichtet. In Tabelle 7 sind die Nachweise bis 2014 zusammengestellt.

Tab. 7: Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei Haus- und Heimtieren

<u>Land/Jahr</u>	<u>Sequenztyp/klonaler Komplex</u>	<u>Referenz</u>
UK, London, 2005	EMRSA-15 (ST22)	[9]
Deutschland, 2005	ST22	[10]
UK, 2005	EMRSA-15	[5]
Irland, 2006	EMRSA-15	[188]
Deutschland, 2006	ST22	[126]
UK, Irland 2006	CC22	[127]
Kanada, 2006	Canadian-epidemic-MRSA2	[11]
Deutschland, 2008	ST22, ST239	[63]
Deutschland, 2008	ST80	[186]
Kanada, 2009	ST5, ST22	[8]
USA, 2010	ST5, ST8, ST105, ST830, und ST986	[129]
Kanada, 2010	CC398	[192]
Irland, 2010	CC5, CC8, CC22	[190]
Frankreich, 2011	ST8, ST398	[193]
China, 2011	ST59, ST239, ST398	[194]
Malaysia, 2012	ST1241, ST59	[195]
Rio de Janeiro, 2013	ST30	[196]
England, 2013	CC22	[197]
Deutschland, 2014	CC22, CC5, CC8, CC395	[131]
Österreich, 2014	ST398, ST254, ST22, ST5 and ST1	[134]

In den letzten Jahren wurden verschiedene Tierarten auf *S. aureus* untersucht. Die Spitzenposition der getesteten Haustiere nehmen immer noch Katze und Hund in Anspruch. Kleine Heimtiere wie z.B. Meerschweinchen und Hamster sowie Vögel machen allerdings ebenfalls einen großen Anteil der Haustiere mit möglicherweise engem Kontakt zu Menschen aus. Daher ist es wichtig zu wissen, ob auch sie Träger von *S. aureus* sein können und so ein mögliches Reservoir dieses Pathogens darstellen und ob sie eventuell sogar selbst Infektionen durch *S. aureus* ausgesetzt sind. Einige Untersuchungen in Tierkliniken erbrachten positive Nachweise für *S. aureus* bei den genannten Tierarten [63], [183], [190]. Zusätzlich wurden auch bei Exoten *S. aureus*-Stämme unterschiedlicher Sequenztypen isoliert. Die bisher publizierten Berichte finden sich in Tabelle 8 wieder.

Tab. 8: Berichte über gefundene Sequenztypen (ST) und klonale Komplexe (CC) bei anderen Tieren und Exoten

<u>Land/Jahr</u>	<u>Spezies</u>	<u>Sequenztyp/klonaler Komplex</u>	<u>Referenz</u>
USA, 2005	Kaninchen, Papagei	Nicht bekannt	[191]
Irland, 2005	Kaninchen Seelöwen	EMRSA-15	[183]
Deutschland, 2008	Meerschwein Kaninchen Papagei Fledermaus Schildkröte	ST22 ST22 ST22 ST22 ST22	[63]
Deutschland, 2009	Meerschwein	CC398	[198]
Niederlande, 2009	Ratten	ST398, ST97	[199]
Nordamerika, 2009	Delfine, Walross	USA100	[200]
Niederlande, 2010	Gorilla	CC398	[201]; [202]
Kanada, 2012	Alpaka	ST8	[203]
USA, 2012	Waldkaninchen, Kleiner Gelbschenkel, Watvogel	CC8, CC5	[204]

### 2.5.3. Charakteristika von MRSA Isolaten des CC398

Mit Hilfe von molekularen Typisierungsmethoden ist es möglich, Isolate bestimmte Charakteristika zuzuordnen. Isolate des CC398 besitzen typische Eigenschaften. Sie sind beispielsweise nicht typisierbar mittels PFGE unter Verwendung des Restriktionsenzym *Sma*I. Der Verdau der DNA durch *Sma*I wird durch eine Methylierung der *recognition site* verhindert. Dies führte in der Literatur häufig dazu, dass MRSA ST398 Isolate auch als *non-typeable* (NT)-MRSA bezeichnet wurden. *Bosch et al.* veränderten das *Sma*I-Standardprotokoll für Isolate des CC398 unter Verwendung eines Neochizomers von *Sma*I (*Cfr9I*, *Xma*I) so, dass es nun möglich ist, vergleichbare Bandenmuster zu erhalten [95]. Durch die Analyse mittels MLST werden Isolate bestimmten Sequenztypen zugeordnet. Diese können dann, wie bereits beschrieben, klonalen Linien zugeordnet werden (siehe Abschnitt 2.5.1). Der klonale Komplex wird nach dem Sequenztyp mit der höchsten Anzahl an SLVs und DLVs benannt und beziffert. Der CC398 besteht bislang aus 8 ST's (2010), der dominierende Typ ist allerdings der ST398 und gibt somit dem klonalen Komplex seinen Namen [17]. Durch Sequenzierung der „repeat-region“ des Protein A von *S. aureus* erhält man einen *spa*-Typen (siehe 2.4.3. *spa*-Typisierung). Die zum CC398 gehörenden Isolate können einer Vielzahl von *spa*-Typen zugeordnet werden. Die wichtigsten *spa*-Typen, die mit diesem klonalen Komplex assoziiert werden, sind untenstehend aufgelistet (Tabelle 9).

Die meisten dieser Typen sind Kombinationen der *spa*-repeat Sequenzen r02, r08, r16, r24, r25 und r34. Die verschiedenen repeat-Muster sind eng miteinander verwandt. In der letzten Zeit konnten weitere *spa*-Typen mit CC398 Isolaten assoziiert werden, und deshalb scheint es durchaus möglich, dass noch weitaus mehr verschiedene *spa*-Typen vorhanden sind, die erst in der Zukunft beschrieben werden können.

Ein weiteres Merkmal der CC398-MRSA-Isolate ist oftmals der Besitz von SCC*mec*-Elementen IV und V. Zusätzlich kann eine weitergehende Differenzierung des Elements IV vorgenommen werden [205]. Nicht alle CC398-Isolate können mit den üblich angewendeten SCC*mec*-Typisierungsmethoden klassifiziert werden. Deshalb sind oftmals Isolate des ST398 nicht typisierbar oder werden „neueren“ SCC*mec*-Typen (VII, VIII) zugeordnet [25].

Der Großteil aller Isolate ist resistent gegen Tetrazykline. In unterschiedlichem Maße wurden ebenfalls Resistenzen gegen Makrolide, Lincosamide, Aminoglykoside, Trimethoprim und gegen Fluorquinolone gefunden [25].

Tab. 9: : Auflistung der bislang bei *S. aureus*-Stämmen des CC398 publizierten *spa*-Typen

<u>spa-Typ</u>	<u>Repeat-Abfolge</u>	<u>Referenz</u>
t011	08-16-----02-25-----34-----24-25	[206]
t034	08-16-----02-25-----02-25-34-----24-25	[206]
t108	08-16-----02-----34-----24-25	[24]
t567	08-----02-25-----24-25	[24]
t571	08-16-----02-25-----02-25-34-----25	[207]
t779	08-----	[208]
t898	08-16-----02-25-----02-25-34-----34-24-25	[207]
t943	08-16-----02-25-----25-----24-25	[24]
t1197	08-16-----02-25-----46-----24-25	[23]
t1250	08-16-----02-25-----02-25-----	[209]
t1254	106-16-----02-25-----34----- --24-25	[13]
t1255	08-16-----34-----24-25	[141]
t1451	08-16-----02-25-----34-----25	[208]
t1456	08-16-----02-25-----	[178]
t1457	08-16-----02-25-----34-02-25-34-----24-25	[208]
t2346	08-16-----02-25-----34-24-----24-25	[210]
t2383	08-16-----	[15]
t2970	08-16-----02-25-----34-----34-24-25	[208]
t3015	08-----02-25-----24-----24-25	[208]
t3119	08-85-----02-25-----34-----24-25	[208]
t4208	08-16-----02-31-----25-34-----24-25	[208]
t4872	08-16-----02-25-----34-24-25-34-24-25	[25, 59]
t337	07-16-23-23-02-12-23----02----34-----	[207]
t899	07-16-23----02-----34-----	[25]
t1939	07----23----02-----34-----	[25]

## 2.5.4. Risiken für den Menschen – das zoonotische Potential

Ein spezifisches Risiko des Menschen für eine Besiedlung mit ST398 ist der direkte und enge Kontakt zu landwirtschaftlich genutzten Tieren [21], [211], [141]. Zahlreiche Nachweise bei Landwirten, Schlachthofpersonal und Tierärzten sowie deren Familien führten zur Aufnahme dieses Risikofaktors in die MRSA-Präventionsempfehlungen des RKI für Krankenhäuser [212]. Schwere Infektionen beim Menschen offenbaren ein hohes zoonotisches Potential [64]; [14]; [213]; [16]. Das Vorkommen von Enterotoxinen ist derzeit noch in fast allen CC398-Isolaten begrenzt. Mit der Ausnahme von einigen wenigen Isolaten, die das PVL-Gen besitzen, sind die heutigen ST398-Stämme negativ für wichtige Virulenzgene von *S. aureus* [18]. Von ersten PVL-positiven Isolaten beim Menschen wurde allerdings berichtet [17]; [18]; [201]; [214]. Die Infektionen mit *S. aureus* des Sequenztyps ST398 sind bisher noch selten, können aber durchaus schwerwiegend sein. Zu einem Ausbruch in einem Krankenhaus, dessen Ursprung nicht vollständig geklärt werden konnte, kam es 2007 in den Niederlanden [14]. Bei keinem der Patienten konnte ein direkter Kontakt zu Schweinen oder der Landwirtschaft nachgewiesen werden. Die Übertragung von MRSA-ST398 durch das Personal (exponierte Personen vorhanden) auf die Patienten konnte nicht ausgeschlossen werden. Neben schweren Krankheitsverläufen sind ebenfalls erste Todesfälle bekannt. So verstarb ein 14-jähriges Mädchen an einer nekrotisierenden Pneumonie, verursacht durch MRSA ST398 [18]. Ein 78-jähriger Mann, ohne Kontakt zu Farm- oder Haustieren verstarb an einem akuten myokardialen Infarkt infolge eines schweren Verlaufes von Ventilator-assoziierte Pneumonie. Kulturen von Bronchialsekret dieses Patienten waren positiv für MRSA-ST398 [64]. Diese zwei Fälle zeigen, dass diese relativ neue klonale Linie von *S. aureus* durchaus in der Lage ist, schwerste Krankheitsverläufe zu verursachen. In der nachfolgenden Tabelle 10 wird ein Überblick über bereits publizierte Infektionsgeschehen bei Menschen durch *S. aureus* des CC398 gegeben.

Tab. 10: Infektionen beim Menschen verursacht durch *S. aureus* des CC398

<u>Betroffenes Organ</u>	<u>Erkrankung</u>	<u>Land, Jahr</u>	<u>Referenz</u>
Brustdrüse	Mastitis	Niederlande, 2006	[209]
Ohr	Otitis		
Wundinfektion	Diabetisches Fußulcus	Niederlande, 2007	[14]
Respirationstrakt	Ventilator-assoziierte Pneumonie	Deutschland, 2007	[23]
Wundinfektion	Wundinfektionen		
Haut	Hautinfektionen		

<u>Betroffenes Organ</u>	<u>Erkrankung</u>	<u>Land, Jahr</u>	<u>Referenz</u>
Wundinfektion	Bisswunde durch Schwein	Belgien, 2008	[39]
Haut	Abzess, Furunkulose	Schweden, 2008	[215]
Wundinfektion	Abzess, Ohrekzem		
Respirationstrakt	Pneumonie	China, 2008	[214]
Wundinfektion	Transplantat		
Abzess	Empyem		
Respirationstrakt	Sinusitis	Dänemark, 2008	[17]
Haut	Haut- und		
Wundinfektionen	Weichteilgewebeeinfektionen (SSTI)		
Gefäßsystem	Sepsis, Multiorganversagen		
Wund- /Gelenkinfektion	Postoperatives Gelenkempyem	Österreich, 2009	[210]
Haut	Pyodermatitis		
Haut	Decubitus		
Respirationstrakt	COPD		
Muskulatur	Pyomyositis	Italien, 2009	[216]
Haut	Cellulitis		
	Abzess		
Haut	Abzess, Akne, Hydradenitis	Niederlande, 2009	[15]
Herz-/Kreislauf	Ventilator-assoziierte	Italien, 2010	[64]
Respirationstrakt	Pneumonie		
Gefäßsystem	Sepsis	Italien, 2010	[217]
Haut-, Weichteilgewebe	Nekrotisierende Fasciitis		
Respirationstrakt	Nekrotisierende Pneumonie	Frankreich, 2010	[18]
Haut-, Weichteilgewebe	Postoperative Wundinfektion	Kanada, 2010	[56]
Haut	Wundinfektion	Finnland, 2010	[218]
Pharynx	Tonsillitis	Dänemark, 2012	[219]
Haut	Impetigo		
Knochen	Diabetisches Fußulcus	Frankreich, 2013	[220]
	Osteomyelitis		

Die Brisanz der Verbreitung dieses Sequenztyps wird zusätzlich durch sein Potential zur Aufnahme genetischen Materials verdeutlicht. *S. aureus*-Stämme sind, wie zahlreiche andere Bakterien auch, in der Lage, durch Aufnahme von genetischem Material ihre Virulenz zu verändern bzw. zu erhöhen [91], [221]. Es können beispielsweise neue Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika erworben werden. Die Forschergruppe um *Kehrenberg et. al* fand z.B. ein ST398-Isolat, welches das Resistenzgen *cf* besitzt und somit eine Multiresistenz gegen Fenicol/Lincosamide/Oxazolidinone/Pleuromutilin/Streptogramin A ausbilden kann [20].

Das zunehmende Wissen und die Typisierungsdaten deuteten darauf hin, dass die Präsenz dieses Sequenztyps bei Menschen ein Resultat des gehäuften Auftretens von MRSA-CC398 bei Tieren und speziell bei Nutztieren ist. Dies unterstützte gleichzeitig die Annahme eines möglicherweise im Nutztierbereich „entstandenen“ MRSA-Stammes [25]. Allerdings beschrieben *Price et. al* kürzlich, dass es Hinweise dafür gibt, dass *livestock-associated* MRSA aus MSSA aus humanen Wirten (ancestrale Population des CC398) hervorgegangen sind. Sie gehen davon aus, dass Isolate des CC398 während der Anpassung vom Menschen an das Tier einer sehr schnellen Ausbreitung unterlegen sind, und währenddessen eine Acquirierung der Tetrazyklin- und Methicillinresistenz stattgefunden haben könnte [222]. Eine Publikation von *Uhlemann et. al.* beschreibt MSSA ST398 als eine frequente Ursache von humanen Infektionen in Nordmanhattan. Es konnte kein Kontakt zu Tieren gefunden werden. Genomanalysen weisen darauf hin, dass das Kerngenom der beschriebenen MSSA-Population kleiner ist als das Kerngenom vorhandener „tierassoziiertes“ MRSA ST398. Zum Genomvergleich nutzten sie den LA-ST398 Referenzstamm SO385, welcher auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Autoren gehen davon aus, dass sich die beschriebenen MSSA ST398 unabhängig von Tierkontakt zwischen Menschen verbreiten können [223].

Die Nachweise von Isolaten des CC398 bei vielen Tierarten und dem Menschen sind ein Zeichen für die niedrige Wirtsspezifität dieses Klons und zeigen die Relevanz der weiteren Erforschung dieses klonalen Komplexes. Um Einblicke in die Evolution und die Populationsstruktur des ST398 zu bekommen, werden in dieser Arbeit SNPs in *S. aureus*-Isolaten verschiedener Tierarten und von Menschen untersucht.

## 3. Material

### 3.1. Probenmaterial und -herkunft

Alle nachfolgend beschriebenen *S. aureus*-Isolate des klonalen Komplexes 398 (CC398) wurden aus dem Nasenvorhof von Menschen und Tieren sowie aus Infektionsprozessen von Patienten unterschiedlicher Krankenhäuser und Patienten bestimmter Tierkliniken entnommen. Einzelne Proben stammen aus der Umgebung der jeweiligen Tiere und Personen und beziehen sowohl die Untersuchung von Staub als auch die unmittelbare Umgebung der humanen Patienten mit ein. Keines der in dieser Studie beprobten Tiere wurde mehrmals auf das Vorhandensein von *S. aureus* untersucht. 57 Isolate stammen aus der Stammsammlung des Nationalen Referenzzentrums für Staphylokokken des Robert Koch-Instituts, Außenstelle Wernigerode. Des Weiteren wurden Isolate aus Deutschland (5), Österreich (17), den Niederlanden (15), Belgien (5), dem Vereinigten Königreich (5), den USA (5) und Italien (3) in das Projekt aufgenommen. Eine Auflistung aller 112 *S. aureus*-Isolate und die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 11 dargestellt. Für einen großen Teil der Isolate lagen diese Daten bereits vor Beginn der Promotion vor.

Die für diese Untersuchung benötigten Primer lagen ebenfalls bereits im Robert Koch-Institut vor (siehe Tabelle 21) [110]. Fünf Primer mussten von den Untersuchungen ausgeschlossen werden, da auch nach mehrmaligen Versuchen keine Bindung an die DNA stattfand. Insgesamt konnten 41.199bp (basepairs, engl. Basenpaare) untersucht werden. Auf das Gesamtgenom von *S. aureus* bezogen stellt das einen Anteil von ca. 1,5 % dar. Alle Isolate wurden im Robert Koch-Institut auf Blutagar angezüchtet. Anschließend fand die Speziesdiagnostik wie nachfolgend beschrieben statt (siehe Abschnitt 4.1. und folgende). Zur weiteren Untersuchung sowie Typisierung gehörten die Resistenzbestimmung, die Spezifizierung des *spa*-Typs und der *SCCmec*-Elemente. Einzelne Isolate wurden mittels MLST untersucht. Ausgewählte Isolate wurden mittels PFGE analysiert.

Eine Auflistung welche Arbeiten durch welche Mitarbeiter durchgeführt wurde, findet sich im Methodenteil wieder.

Tab. 11: Isolate

Stamm	Synonym	Infektion	Isolations- datum	Land	SCCmec	SpaTyp	Haplotyp	Spezies	Kollektion	Resistenzphänotyp
04-03094	MRSA	unbekannt	2004	Deutschland	V	t034	H7	Mensch	Bakum	PEN,ERY, OXA, CLI, TET,
05-02057		Vetmed KKH	2005	Deutschland	V	t011	H35	Hund	Strommenger	PEN; ERY; CLI; TET
06-00262	E 64	Wundinfektion	2006	Österreich	IV	t011	H35	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
06-00880		Besiedlung	2006	Österreich	IV	t011	H34	Pferd	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
06-00903	BK 201770	Bakteriämie	2006	Deutschland	V	t011	H35	Mensch	Witte	PEN; ERY; CLI; TET; CIP
06-02016	Shila	Besiedlung	2006	Österreich	IV	t011	H34	Pferd	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
06-02985	M1960	KKH	2006	Österreich	V	t011	H35	Mensch	Witte	PEN; TET; SXT
06-03005	242003	Wundinfektion	2006	Deutschland	MSSA	t571	H12	Mensch	Witte	ERY
06-03034	VA 318796	KKH	2006	Deutschland	V	t034	H27	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; SXT
07-00334	M 25	Besiedlung	2007	Österreich	IV	t011	H34	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; TET; SXT
07-00415	1000 4239	KKH	2007	Deutschland	V	t034	H25	Mensch	Witte	PEN; TET
07-00471	M 34	Besiedlung	2007	Österreich	IV	t011	H34	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-00755	W 372/06	Wundinfektion	2007	Österreich	IV	t011	H34	Pferd	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-00757	W 1129/06	Wundinfektion	2007	Österreich	IV	t011	H34	Pferd	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-01238	H 99	Besiedlung	2007	Österreich	IV	t011	H34	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-01239	H 101	Besiedlung	2007	Österreich	IV	t011	H34	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-01274	159	Besiedlung	2007	Deutschland	V	t034	H5	Schwein	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; SXT
07-01335	H 73	Besiedlung	2007	Österreich	IV	t011	H34	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-01337	R 109	Besiedlung	2007	Österreich	IV	t011	H34	Pferd	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-01388	E 120	Besiedlung	2007	Österreich	IV	t011	H34	Pferd	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-01429	2451294	Wundinfektion	2007	Deutschland	MSSA	t571	H12	Mensch	Witte	ERY
07-01494	235633	Wundinfektion	2007	Deutschland	V	t034	H6	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
07-01640	235633	Wundinfektion	2007	Deutschland	V	t034	H6	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
07-01653	VA 9476872-WA	Wundinfektion	2007	Deutschland	V	t034	H30	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; CIP; SXT; MFL
07-01730	H120	Besiedlung	2007	Österreich	IV	t011	H34	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-01826	81	Wundinfektion	2007	Deutschland	MSSA	t1197	H35	Mensch	Witte	TET; CIP; SXT; MFL
07-01949	E 130	Besiedlung	2007	Österreich	IV	t011	H34	Pferd	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-02239	VA 312822	Wundinfektion	2007	Deutschland	V	t108	H14	Mensch	Witte	PEN; OXA; TET; CIP; MFL
07-02347	88 732B 755	KKH	2007	Deutschland	nt	t034	H7	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET

Stamm	Synonym	Infektion	Isolations- datum	Land	SCCmec	SpaTyp	Haplotyp	Spezies	Kollektion	Resistenzphänotyp
07-02415	1	Besiedlung	2007	Deutschland	V	t2974	H24	Schwein	Witte	PEN; OXA; TET
07-02424	11	Besiedlung	2007	Deutschland	V	t011	H28	Schwein	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-02431	H2	Besiedlung	2007	Deutschland	V	t011	H29	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-02432	H3	Besiedlung	2007	Deutschland	V	t011	H28	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-02433	H4	Besiedlung	2007	Deutschland	V	t011	H28	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-02464	H12	Besiedlung	2007	Deutschland	MSSA	t034	H19	Mensch	Witte	PEN; ERY; CLI; TET; SXT
07-02558	88 735B 930	Abszess	2007	Deutschland	V	t034	H8	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
07-02632	H 824	Besiedlung	2007	Deutschland	V	t034	H6	Mensch	Blaha	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; SXT
07-02642	H 827	Besiedlung	2007	Deutschland	V	t034	H18	Mensch	Blaha	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; SXT
07-03026	25533	Wundinfektion	2007	Deutschland	V	t011	H35	Mensch	Witte	PEN; OXA; TET
07-03443		Besiedlung	2007	Deutschland	V	t034	H9	Schwein	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
08-00301	B 11	Besiedlung	2008	Deutschland	V	t011	H28	Schwein	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT; TGC
08-00306	H 2	Besiedlung	2008	Deutschland	V	t011	H28	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; TGC
08-00307	H 3	Besiedlung	2008	Deutschland	V	t011	H28	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; TGC
08-00308	H 4	Besiedlung	2008	Deutschland	V	t011	H28	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT; TGC
08-00360	H 6	Besiedlung	2008	Deutschland	MSSA	t034	H21	Mensch	Witte	PEN; TET; SXT; TGC
08-00401	16	Besiedlung	2008	Deutschland	V	t034	H35	Schwein	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; SXT; TGC
08-00537		Gelenk	2008	Deutschland	MSSA	t034	H11	Pute	Blaha	PEN; ERY; CLI; TET; CIP
08-00543		Gelenk	2008	Deutschland	MSSA	t034	H11	Pute	Witte	PEN; TET
08-00700	H1	Besiedlung	2008	Deutschland	MSSA	t011	H35	Mensch	Witte	PEN; ERY; CLI; TET
08-00798		Sehnenscheide	2008	Deutschland	MSSA	t034	H11	Pute	Witte	PEN; ERY; CLI; TET
08-00888		Besiedlung	2008	Deutschland	MSSA	t034	H11	Pute	Witte	PEN; TET; CIP
08-00907	H 1	Besiedlung	2008	Deutschland	V	t011	H35	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
08-00912	S 5	Besiedlung	2008	Deutschland	V	t034	H30	Schwein	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; SXT
08-01058	H 4	Besiedlung	2008	Deutschland	MSSA	t034	H35	Mensch	Witte	PEN; TET; SXT
08-01223	H 4,1	Besiedlung	2008	Deutschland	MSSA	t034	H35	Mensch	Witte	PEN; TET; SXT
08-01388	VA 309257	Perikard	2008	Deutschland	V	t011	H35	Mensch	Witte	PEN; OXA; TET
08-01605	H 800/2	Besiedlung	2008	Deutschland	MSSA	t011	H35	Mensch	Witte	PEN; ERY; CLI; TET; SXT
08-01712	S 1a	Besiedlung	2008	Deutschland	V	t011	H35	Schwein	Witte	PEN; OXA; TET; SXT
08-01737	H 28 S 3	Besiedlung	2008	Deutschland	V	t011	H26	Schwein	Witte	PEN; OXA; TET; SXT
08-01849		Besiedlung	2008	Deutschland	V	t011	H17	UU (allgemein)	Witte	PEN; OXA; TET
08-02208		Besiedlung	2008	Deutschland	V	t034	H31	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
08-02418	E 855	Wundinfektion	2008	Deutschland	V	t034	H20	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET

Stamm	Synonym	Infektion	Isolations- datum	Land	SCCmec	SpaTyp	Haplotyp	Spezies	Kollektion	Resistenzphänotyp
08-02710	339	unbekannt	2009	Deutschland	MSSA	t034	H6	Mensch	Witte	PEN; ERY; CLI; TET
08-02807	579	Besiedlung	2009	Deutschland	V	t034	H18	Mensch	Witte	PEN; ERY; CLI; TET
09-00339	2006S318	Besiedlung	2006	Belgien	V	t011	H35	Mensch	Hallin	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; CIP; SXT; MFL
09-00340-1	2006S488	unbekannt	2006	Belgien	IV	t011	H33	Pferd	Hallin	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
09-00341	2007S256	unbekannt	2007	Belgien	V	t011	H35	Schwein	Hallin	PEN; OXA; TET; CIP; MFL
09-00342	2007S174	unbekannt	2007	Belgien	V	t011	H23	Huhn	Hallin	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
09-00343	2007S413	unbekannt	2007	Belgien	V	t011	H35	Pferd	Hallin	PEN; OXA; TET
09-00393	1	Besiedlung	2009	Deutschland	V	t034	H3	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
09-00443	H2	Besiedlung	2009	Deutschland	V	t011	H28	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
09-00444	H3	Besiedlung	2009	Deutschland	V	t011	H28	Mensch	Witte	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; SXT
09-00445	H4	Besiedlung	2009	Deutschland	V	t011	H28	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; SXT
09-00709	1	Besiedlung	2009	Deutschland	V	t034	H30	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
09-00711		Besiedlung	2009	Deutschland	V	t034	H35	Schwein	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
09-01308	SW 61.2	unbekannt	2008	USA	V	t034	H2	Schwein	Fitzgerald	PEN; OXA; TET
09-01309	SW 181.1	unbekannt	2008	USA	V	t034	H2	Schwein	Fitzgerald	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
09-01310	SW 31.1	unbekannt	2008	USA	V	t034	H2	Schwein	Fitzgerald	PEN; OXA; TET
09-01311	05.9498.K	Septikämie	2005	Ver. Königreich	MSSA	t034	H1	Mensch	Fitzgerald	PEN
09-01312	NY.ST398	unbekannt	2009	USA	MSSA	t571	H13	Mensch	Fitzgerald	PEN; ERY
09-01313	07.6579.J	KKH	2006	Ver. Königreich	V	t034	H16	UU (allgemein)	Fitzgerald	PEN; OXA
09-01314	07.8588.D	Wundinfektion	2007	Ver. Königreich	V	t034	H16	Mensch	Fitzgerald	PEN; OXA
09-01315	07.2736.J	Bauchnabel	2007	Ver. Königreich	V	t034	H16	Mensch	Fitzgerald	PEN; OXA
09-01316	HU 01010T	unbekannt	2008	USA	V	t034	H2	Mensch	Fitzgerald	PEN; OXA; TET
09-01318	07.764-0.5	Bauchnabel	2007	Ver. Königreich	V	t034	H16	Mensch	Fitzgerald	PEN; OXA
09-02165	1	Besiedlung	2009	Deutschland	V	t034	H18	Schwein	Witte	PEN; OXA; CLI; TET
09-02423		Besiedlung	2009	Deutschland	III	t011	H35	Mensch	Witte	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
09-02427	1	Besiedlung	2009	Niederlande	MSSA	t034	H2	Hund	Wagenaar	PEN; TET
09-02428	2	Besiedlung	2009	Niederlande	IV	t011	H32	Hund	Wagenaar	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET
09-02429	8	Besiedlung	2009	Niederlande	IV	t011	H32	Hund	Wagenaar	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET
09-02431	4	Besiedlung	2009	Niederlande	V	t1197	H22	Pferd	Wagenaar	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; CIP; MFL
09-02432	5	Besiedlung	2009	Niederlande	IV	t011	H32	Pferd	Wagenaar	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET; CIP; MFL
09-02434	16	Besiedlung	2009	Niederlande	V	t011	H35	Pferd	Wagenaar	PEN; OXA; TET
09-02435	3	Besiedlung	2009	Niederlande	V	t011	H35	Schwein	Wagenaar	PEN; OXA; TET

Stamm	Synonym	Infektion	Isolations- datum	Land	SCCmec	SpaTyp	Haplotyp	Spezies	Kollektion	Resistenzphänotyp
09-02436	7	Besiedlung	2009	Niederlande	IV	t011	H32	Schwein	Wagenaar	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET
09-02437	12	Besiedlung	2009	Niederlande	V	t1457	H10	Schwein	Wagenaar	PEN; OXA; TET
09-02438	27	Besiedlung	2009	Niederlande	V	t011	H35	Schwein	Wagenaar	PEN; OXA; TET
09-02439	28	Besiedlung	2009	Niederlande	V	t1457	H10	Schwein	Wagenaar	PEN; OXA; TET
09-02440	9	Besiedlung	2009	Niederlande	IV	t011	H32	Rind	Wagenaar	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET
09-02441	10	Besiedlung	2009	Niederlande	V	t571	H1	Rind	Wagenaar	PEN; OXA; ERY; CLI; TET
09-02442	11	Besiedlung	2009	Niederlande	IV	t011	H32	Rind	Wagenaar	PEN; OXA; GEN; ERY; CLI; TET
09-02444	13	Besiedlung	2009	Niederlande	V	t108	H14	Ziege	Wagenaar	PEN; OXA; TET
09-02476	44	Abszess	2007	Italien	IV	t899	H15	Mensch	Pantosti	PEN; OXA; TET; SXT
09-02477	45	Besiedlung	2007	Italien	V	t108	H4	Mensch	Pantosti	PEN; OXA; ERY; CLI; TET; CIP; SXT; MFL
09-02478	46	Besiedlung	2007	Italien	MSSA	t899	H15	Mensch	Pantosti	PEN; TET
09-02611	7	Besiedlung	2009	Deutschland	V	t034	H18	Mensch	Witte	PEN; OXA; TET
09-02615	15	Besiedlung	2009	Deutschland	V	t034	H18	Schwein	Witte	PEN; OXA; TET
09-03323	19377	Haut	2009	Deutschland	nt	t1344	H35	Hund	Walther	PEN; OXA; TET
09-03324	19425	Haut	2009	Österreich	IV	t011	H32	Pferd	Walther	PEN; OXA; GEN; TET
09-03325-1	19428	Wundinfektion	2009	Deutschland	IV	t011	H32	Pferd	Walther	PEN; OXA; GEN; TET; CIP; SXT; MFL
09-03326	19446	Haut	2009	Österreich	IV	t011	H32	Pferd	Walther	PEN; OXA; GEN; TET; SXT
09-03327	19447	Ohr	2009	Deutschland	nt	t034	H7	Katze	Walther	PEN; OXA; ERY; CLI; TET

Tabelle 11 zeigt in Spalte 1 und 2 die jeweiligen Isolatennummern des RKI, und ob es einen hospitalen Hintergrund gibt. Die genauen Isolationsdaten sind nicht bei allen Isolaten bekannt. Es wurden alle konkreten Daten in Spalte 3 aufgeführt. Des Weiteren sind das Land, aus dem der jeweilige Träger oder Patient kommt, sowie SCCmec, spa, Haplotyp und Spezies genannt. Die vorletzte Spalte gibt den Namen des Leiters/ der Leiterin des bereitstellenden Labors an. Die letzte Spalte zeigt die jeweiligen Resistenzschemata für jedes einzelne Isolat. PEN=Penicillin; OXA= Oxacillin; ERY= Erythromycin; CLI= Clindamycin; TET= Tetrazyklin; CIP= Ciprofloxacin; SXT= Trimethoprim-Sulfamethoxazol; MFL= Moxifloxacin GEN= Gentamycin; TGC= Tigecyclin, KKH= Krankenhaus, UU= Umgebungsuntersuchung, MRSA = methicillin-resistenter *S.aureus*, MSSA = methicillin-sensibler *S.aureus*, in der Spalte Kollektion sind die Namen der Isolate bereitstellenden Wissenschaftler angegeben

### 3.2. Geräte

Tab.12: Auflistung der verwendeten Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklaven	Biomedis, München
Brutschränke (30°C, 37°C)	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	Roth, Karlsruhe
dHPLC WAVE™-System®	Transgenomic Inc., Omaha, USA
DNA Engine Dyad™Peltier Thermal Cycler®	Biozym, Hamburg
Eismaschine	ZIEGRA, Isernhagen
Elektrophoresekammer	BioRad, München
Geldokumentationssystem (GelDOCI 70-8170)	BioRad, München
Gefrierschränke -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
-80°C	Heraeus, Hanau
Grobwaage	Sartorius, Göttingen
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Minishaker MS 1	Roth, Karlsruhe
Mikrowelle 700	Severin, Sündern
Netzgeräte Power Pac 300	BioRad, München
pH-Meter CG840	Schott, Mainz
PCR-Geräte - Multicycler PTC200®	Biozym, Hess.Oldendorf
- GeneAmp PCR-System9700®	PE Applied Biosystems, USA
Pipetten Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (0,1ml - 5,0ml)	Eppendorf, Hamburg
PFGE-Kammer und Cooling Module	BioRad, München
RAD-ChefDR® III-System®	
Reaktionsgefäße (0,2ml)	Biozym, Hess.Oldendorf
(1,5ml-2,0ml)	Eppendorf, Hamburg
Sep®HT Säule	Transgenomic, Inc., Omaha, USA
Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau
Schüttelmaschine SM30	Edmund Bühler, Hechingen
SmartSpec™3000 Spectrometer®	BioRad, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer MS2®	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad GFL 1086	Heraeus, Hanau

### 3.3. Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien sowie Enzyme sind über die in Tabelle 13 aufgeführten Firmen bezogen worden.

Tab.13: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Enzyme

Agarose Typ II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Serva, Boeringer Ingelheim, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Längenstandard, NEB	Bio-Rad, München
GeneRuler® 100bp Ladder plus	Fermentas GmbH, Leon-Rot
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
HCL	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	GE Healthcare, München Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Transgenomic Inc., Omaha, USA
Optimase Polymerase	Amersham bioscience, UK
PuReTaq "ready-to-go"	Amersham bioscience, UK
PCR-Beads	WAVE Optimized Buffer; Transgenomic, Inc., Omaha, USA
Puffer A und B	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin
PCR-Primer	Gibco BRL, Karlsruhe
Proteinase K	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	BioLabs, Ipswich
Xmal- Enzym	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris	Qiagen, Hilden
QIAgen PCR Purification Kit®	CLONDIAG, Jena
StaphyType™ Kit	

### 3.4. Nährmedien

Folgende Nährbouillon und Kochsalzlösungen, welche für diese Arbeit verwendet wurden, sind im Labor für Nährmedien des Robert Koch-Institutes, Bereich Wernigerode, hergestellt oder über nachfolgend aufgeführte Firmen bezogen worden. Alle Puffer sind direkt bei der jeweiligen Methode angeführt.

NaCl:		0,7 %
Nährbouillon 1000 ml:	Pepton	0,1 g
	Hefeextrakt	0,1 g
	NaCl	50,0 mg
	Agar	20,0 g

Müller- Hinton- Schafblutagar:	OXOID, Wesel
BBL CHROMagar MRSA:	OXOID, Wesel
Trypticase-Soy-Broth TSB:	BD Diagnostic Systems, Heidelberg
Lucia Bertani Flüssigmedium LB: auf 1000ml	Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 5 g
PIV Puffer	10 mM Tris pH 8.0 and 1 M NaCl

### 3.5. Verwendete Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika (Tabelle 14) wurden über die aufgeführten Firmen bezogen und als Trockensubstanz bei 4°C aufbewahrt. Für die entsprechenden Versuche wurden die Stammlösungen frisch hergestellt.

Tab. 14: Auflistung der verwendeten Antibiotika

Penicillin G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oxacillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gentamicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Linezolid	Molekula-Deutschland GmbH, Kranzberg
Erythromycin	ABBOTT Laboratories, North Chicago
Clindamycin	Salutas Pharma GmbH, Magdeburg
Oxytetracyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vancomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Teicoplanin	Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Ciprofloxacin	Fluka, Taufkirchen
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rifampicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fusidinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mupirocin	GlaxoSmithKline GmbH &Co. KG
Moxifloxacin	Bayer AG, Leverkusen
Daptomycin	Novartis Pharma AG, Basel

### 3.6. Verwendete Software®

Tabelle 15 zeigt die Zusammenstellung der verwendeten Software und deren Bezugsquellen.

Tab. 15: Auflistung der verwendeten Software

LaserGene Version 7.2.1.(1),410	Erstellen und Assemblieren von Sequenzen	DNASTAR Inc., Lizenz Robert Koch-Institut
Image Reader V1.5E	Dokumentation und Verarbeitung von Agarosegelen	Fuji Foto Film
Bionumerics Version 6.0	SNP-Analysen	Applied Maths, Lizenz Robert Koch-Institut
NCBI BLAST	paarweise und multiple Sequenzvergleiche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
Navigator™ Software	Auswertung von Chromatogrammen	Transgenomic Inc., Lizenz Robert Koch-Institut
Sanger Artemis v10	Annotierung der Sequenzdaten	Sanger Institute, Freeware
DnasP Version 4.20.2	Datenanalyse der Nukleotidpolymorphismen	Freeware
Beast Version 2.0.1	Demographische Analysen/ Populationsgröße	Freeware
TraceEditPro	Analyse der MLST-Sequenzen	Ridom Bioinformatics, Lizenz Robert Koch-Institut CLONDIAG, Lizenz Freie
ArrayMate Reader	Analyse der Microarrays	Universität Berlin

## 4. Methoden

### 4.1. Bakterienanzucht und Speziesdiagnostik

Die Spezies-Diagnostik, phänotypische Resistenzbestimmung und weiterführende molekulare Typisierung erfolgten durch die wissenschaftlichen Mitarbeiter am Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode (Dr. F. Layer, Dr. Ch. Cuny, E. Baier, P. Vielbrandt, B. Pasemann, C.Cuny, A. Weller).

Anzucht, Stammhaltung, DNA Präparation, PCR,	A. Weller, M. Henkel,
dHPLC:	A. Wittenberg
<i>spa</i> -Typisierung, SCC <i>mec</i> , PFGE:	B. Pasemann, P. Vilbrandt, C. Cuny
MLST:	A. Wittenberg
Microarrays, PCR's Nachweis sek. MSSA:	A. Wittenberg
Isolateanzucht, Präparation Transmissionsstudie:	Dr. Ch. Cuny

Alle verwendeten Stämme wurden auf Mueller-Hinton Blutagar bei 37°C für 18 bis 24 Stunden kultiviert. Die Stämme des Nationalen Referenzlabors für Staphylokokken wurden zusätzlich auf dem Selektivmedium CHROMagar unter den gleichen Bedingungen angezüchtet. Diese speziellen Selektivagar sind geeignet, um MRSA von KNS zu unterscheiden, denn MRSA bilden auf diesen Medien malvenfarbene Kolonien aus.

#### **Speziesdiagnostik für *Staphylococcus aureus***

Um eine Speziesdiagnostik für Staphylokokken durchzuführen, zieht man als erstes die Kulturmorphologie auf der Nährmedienplatte heran. Rein optisch erscheinen *S. aureus*-Kolonien auf Blutagar als mittelgroße (1 bis 3 mm), feuchte, weiß- bis goldgelb pigmentierte Kolonien mit unterschiedlich ausgeprägter Hämolyse. Mittels Gram-Färbung sind sie unter dem Mikroskop als blaue Haufenkokken zu erkennen. Anschließend führt man den Katalasetest durch. Hierbei wird ein Tropfen Katalase-Reagenz (3-prozentige Wasserstoffperoxidlösung) auf einen Objektträger gegeben und eine Platinöse mit Bakterienmaterial kurz hineingehalten. Besitzen die Bakterien Katalase, wird eine direkte Blasenbildung auf dem Objektträger sichtbar. Die Katalase- und Gram-positiven Erreger werden zur weiteren Speziesdiagnostik und zur Differenzierung von den Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) dem Verklumpungsfaktor-Test („*Clumping Factor*“) und dem Koagulasetest unterzogen. Zum Nachweis des Verklumpungsfaktors werden Bakterien

auf einem Objektträger in einem Tropfen 0,9-prozentige NaCl-Lösung suspendiert. Danach wird ein Tropfen des Nachweisreagens (z.B. humanes Citratplasma) dazu gegeben. Der Test ist positiv, wenn innerhalb von 30 Sekunden ein Verklumpen der Suspension auftritt. Der Koagulasetest soll zeigen, ob die Staphylokokken Citratplasma koagulieren können. Dazu werden 300 µl einer Bakterienkultur in Nährbouillon mit 300 µl humanem Citratplasma vermischt und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Wird von den Bakterien Koagulase produziert, führt dies zur Aktivierung von Fibrinogen (→ Fibrin). Sind die Stämme negativ für die Koagulase-Reaktion mit humanem Plasma, so wird zusätzlich mit Rinder- bzw. Kaninchenplasma getestet. Im Anschluss wird ein Speziesnachweis für *S. aureus* mittels PCR durchgeführt.

#### **4.2. Phänotypische Antibiotikaresistenzbestimmung**

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde am Robert Koch-Institut mittels Mikrobouillonverdünnungstest nach DIN 58940 durch Angestellte des Institutes durchgeführt. Die MHK ist die niedrigste mögliche Konzentration einer antibiotischen Substanz (in µg/ml oder mg/l angegeben), die das Keimwachstum unter Versuchsbedingungen hemmt. Es handelt sich um einen Reihenverdünnungstest, bei dem geometrische Verdünnungen des zu testenden Antibiotikums in ein flüssiges Nährmedium mit dem zu testenden Erreger inokuliert werden (Bouillondilutionsmethode). Die Bandbreite der untersuchten Konzentrationen pro Wirkstoff variieren in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Bakterienspezies. Die wirkstoffhaltigen Röhrchen (Makrodilution) werden mit einer definierten Menge des zu testenden Keimes beimpft und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Das Ergebnis wird visuell oder photometrisch abgelesen und bewertet. Die Konzentration des Antibiotikums, bei dem gerade kein sichtbares Wachstum (keine Trübung) erkennbar ist, gilt als minimale Hemmkonzentration (MHK). Es wurden MHKs für die Substanzen Benzylpenicillin (PEN), Oxacillin (OXA), Gentamicin (GEN), Linezolid (LNZ), Erythromycin (ERY), Clindamycin (CLI), Oxytetracyclin (TET), Rifampicin (RIF), Sulfamethoxazol/Trimethoprim (SXT), Vancomycin (VAN), Teicoplanin (TPL), Ciprofloxacin (CIP), Fusidinsäure (FUS), Mupirocin (MUP), Moxifloxacin (MFL) und Daptomycin (DAP) bestimmt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach DIN 58940. Nach der weltweit gültigen Norm ISO 20776-1 sind die Auswertungskategorien in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) definiert.

### 4.3. DNA-Präparation

Die DNA der Staphylokokken isoliert man mit Hilfe des Qiagen DNeasy®Tissue Kits. Dabei wird nach dem entsprechenden DNA-Extraktionsprotokoll vorgegangen. Einzelkolonien aus Reinkultur werden in 4 ml Lucia-Bertani-Flüssigmedium mit 1% Glycin beimpft und unter Schütteln für 12-18 Stunden inkubiert. Anschließend übernimmt man 1 ml der Übernachtskultur. Diese zentrifugiert man für 5 min bei 8000 U/min und verwirft anschließend den Überstand. Man erhält ein Pellet, das man dann in 200 µl Lysispuffer (bestehend aus 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2% Triton X-100 und 100 µg/ml Lysostaphin) resuspendiert. Um die Bakterien vollständig zu lysieren, inkubiert man die Proben für 5 bis 20 min bei 37°C. Nacheinander werden nun 25 µl Proteinase K (Kit) und 200 µl Puffer AL (Kit) hinzugegeben. Nach gründlichem Vortexen werden die Proben 60 min bei 70°C inkubiert.

Im Anschluss werden 200 µl 96% Ethanol zugegeben, die Proben durchmischt und auf eine DNeasy Spin Säule pipettiert. Es folgt die Zentrifugation für 1 min bei 8000 U/min. Der Durchfluss wird verworfen und nach Überführung der Säule in ein neues 2 ml Röhrchen werden 200 µl Puffer AW1 (Kit) hinzugegeben. Ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 min bei 8000 U/min schließt sich an. Nach nochmaligem Austausch des 2 ml Röhrchens gegen ein neues und dem Verwerfen des Durchflusses werden 200 µl Puffer AW2 (Kit) hinzugefügt. Der abschließende Zentrifugationsschritt dauert 3 min bei 14000 U/min. Nachdem die Säule in ein frisches Röhrchen gegeben worden ist, kann die DNA mittels Zugabe von 50 µl A. bidest. eluiert werden.

Zur Überprüfung der DNA wird eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu werden 2 µl DNA mit 5 µl Ladepuffer vermischt und auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Die Laufzeit beträgt 90 min bei 100 V. Als Laufpuffer für Elektrophoresen wird 1x TBE-Puffer (1 M Tris, 1 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0) benutzt. Zur Sichtbarmachung der Banden wird das Gel für 15 min in Ethidiumbromid (10 µg/ml) gefärbt und abschließend für 15 min gewässert. Die Geldokumentation erfolgt unter UV-Licht. Die Präparation der chromosomalen DNA wurde zum Teil durch A. Weller, Mitarbeiterin des Robert Koch-Instituts Wernigerode durchgeführt. Die Aufbewahrung der verwendeten DNA fand bei -20°C statt. Alle Isolate wurden in Form von Cryo-Proben asserviert und bei -80°C in der Stammsammlung des Robert Koch-Instituts aufbewahrt.

#### 4.4. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Makrorestriktionsanalyse ausgewählter *S. aureus*-Isolate fand mit Hilfe des Enzyms *XmaI* statt.

Nachfolgend sind alle Lösungen und Puffer für die Methode aufgeführt und in ihren einzelnen Schritten erklärt. Diese basiert auf dem Standardprotokoll für die Makrorestriktionsanalyse mittels *SmaI* und wurde für den Verdau mit *XmaI* modifiziert [224].

##### Lösungen für Pulsfeldgelelektrophorese:

Für 10 Proben benötigt man:

LMP-Agarose (1,2%ig in PIV)	24 mg LMP-Agarose
50 ml PIV	2 ml PIV
10 mM Tris-HCl pH8,0	250 µl 2 M Tris-HCl
1,0 M NaCl	10 ml 5M NaCl
	40 ml A. bidest
	pH 8,0

##### Herstellung der Lysislösung

10 ml Lysis-Lösung	6 ml A. bidest.
5 mM Tris-HCl pH 8,0	2 ml 5 M NaCl
100 mM EDTA pH8,0	2 ml 0,5 M EDTA
0,2 % Desoxycholat	30 µl 2 M Tris-HCl
0,5 % Laurylsarkosin	20 mg Na-Desoxycholat
1 M NaCl	50 mg Sarkosyl
	pH 8,0

##### Der Lysislösung sind kurz vor Gebrauch folgende Reagentien hinzuzufügen:

60 µl 10 mg/ml RNase	
(in 10 mM Tris-HCl und 15 mM NaCl pH 7,5;	+ 110 µl 10 mg/ml Lysozym
15 min kochen; langsam abkühlen)	+ 110 µl 5 mg/ml Lysostaphin
1 ml A. bidest.	pH 7,5
10 µl 2 M Tris-HCl	
2 µl 5 M NaCl	

### Benötigte Lösungen für die Deproteinisierung:

40 ml ES-Lösung	EDTA (Dinatriumdihydrogenäthylendiamintetraacetat (Z-hydrat))
0,5 M EDTA pH 9,0	Chelaplex I11
1 % Laurylsarkosin	40 ml 0,5 M EDTA 400 mg Laurylsarkosin
10 ml ESP	EDTA(Dinatriumdihydrogenäthylendiamintetraacetat (Z-hydrat)) Chelaplex I11 10 ml 0,5 M EDTA 100 mg Laurylsarkosin 1 mg/ml Proteinase K
500 ml TE-Puffer	2,5 ml 2 M Tris-HCl
10 mM Tris-HCl	1,0 ml 0,5Na-EDTA
1 mM EDTA	496, 5 ml A. bidest. pH 7,5

### Reagentien für die Restriktase-Spaltung:

für 30 Proben a 50 µl benötigt man:

1x NEB Puffer 4:	150,0 µl	(Endkonzentration: 1 x)
BSA 10 mg/ml:	15,0 µl	(Endkonzentration:0,1mg/ml)
<i>Xma</i> I 10 U/µl:	130,0 µl	(= 40 U)
H <sub>2</sub> O:	1335,0 µl	= 1500 µl insgesamt

### Herstellung des Tris-Borat-Puffers für die Pulsfeldgelelektrophorese:

Für 200ml 10x TBE-Puffer:

1M Tris	24,22 g
1 M Borsäure	12,36 g
4 mM EDTA (Na-frei!)	0,234 g
	200, 0 ml A. bidest.
	pH 8,5

200 ml auf 1800 ml A. bidest. lösen

### **Herstellung des Ladepuffers:**

- 40 mg Na<sub>2</sub> EDTA
- 4 g Saccharose
- 4 mg Bromphenolblau
- 10 ml A. bidest.

### **Protokoll zur Durchführung der Methode:**

Die *Xma*I-Spaltung chromosomaler DNA von *S. aureus* und PFGE teilt sich in mehrere Schritte auf.

#### **1. Anzucht**

- Übernachtskultur in 5 ml TSB (Trypticase-Soy-Broth) unter Schütteln bei 37°C bebrüten

#### **2. Lyse der Staphylokokken-Zellen**

- 1,0 ml der Kultur abzentrifugieren, in 1 ml eiskaltem PIV gut suspendieren, abzentrifugieren
- 50 µl auf 41°C äquilibrierte 1,2%ige LMP-Agarose mit 50 µl Zell-Suspension mischen, sofort in Gießblock einfüllen
- Gießblock für 5 min bei -20°C aufbewahren, dann für 20 min bei 4°C
- Agarose-Streifen mit den eingebetteten Zellen auf saubere Objektträger mittels Glasspatel überführen
- Blöcke von etwa 4 mm Höhe abtrennen und in Eppendorftube geben
- 1 ml Lysis-Lösung hinzugeben, bei 37°C unter leichter Rotation über Nacht bebrüten

#### **3. Deproteinisierung**

- Überstand abgießen; darauf achten, dass das Blöckchen im Röhrchen bleibt
- Blöckchen zweimal mit 1 ml ES-Puffer spülen
- 1 ml ESP-Lösung zufügen; mindestens für 17 h bei 50 °C bebrüten

#### **4. Restriktase-Spaltung**

- ESP-Lösung abgießen
- Blöckchen in Glaszentrifugenröhrchen gefüllt mit 14 ml TE-Puffer überführen
- 3x mit TE-Puffer spülen; 30 - 120 min pro Wasch-Schritt
- Blöckchen in neue Eppendorftubes überführen und für 30 min bei Zimmertemperatur in 1 ml *Xma*I- Puffer äquilibrieren
- *Xma*I-Puffer dekantieren; 50µl frischen *Xma*I-Puffer (Biolabs) und 40 Units Enzym zugeben
- mindestens für 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubieren
- nach der *Xma*I-Verdauung 50 µl Ladepuffer zufügen

## 5. Pulsfeldgelelektrophorese

- Gel: 1 % Sigma-Agarose in 10x Tris-Borat-Puffer
- Blöckchen mittels Glasspatel in Schlitze des Gels einbringen; Schlitze mit LMP-Agarose verschließen
- Lauf des Gels für Chef III: Pumpen-Geschwindigkeit: 60; 14°C; 6 V/cm; 120°
  - Block I 5-15 sec für 7 h
  - Block II 5-60 sec für 19 h

Die Aufbereitung der Proben zur PFGE-Analyse wurde von B. Pasemann, Robert Koch-Institut Wernigerode, durchgeführt. Die Auswertung fand anschließend mit Hilfe der Software Bionumerics 6.0 nach den Kriterien von *Tenover et al.* statt [225].

#### 4.5. Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Mittels MLST-Analyse werden für *S. aureus* Einzelnukleotidpolymorphismen in den Allelen der Carbamatkinase (*arcC*), der Shikimat-Dehydrogenase (*aroE*), der Glycerolkinase (*glpF*), der Guanylatkinase (*gmk*), der Phosphatacetyltransferase (*pta*), der Triosephosphatisomerase (*tpi*) und der Acetylcoenzym A Acetyltransferase (*ygiL*) untersucht [96]. MLST-Untersuchungen wurden nur für einzelne Isolate (09-02476, 09-02477, 09-02478) entsprechend dem nachfolgenden Schema durchgeführt. Ziel war es, bei den genannten Isolaten zu ermitteln, ob diese dem ST398 angehören. In der Literatur wurden *S. aureus* beschrieben, die den *spa*-Typ t899 besitzen und entweder dem ST398 (Allelprofil: 3,35,19,2,20,26,39, [www.mlst.net](http://www.mlst.net)) oder dem ST9 (3,3,1,1,1,1,10) zugeordnet werden können [149].

Zuvor wurden die PCR-Produkte amplifiziert, in 1,4 %igem Elektrophoresegel überprüft und mittels QIAgen PCR Purification Kit aufgereinigt. Anschließend wurden die Ansätze nach unten stehendem Schema pipettiert und durchliefen das Programm seq 55. Eine Liste aller verwendeten Primer findet sich im Anhang wieder.

<b>Ansatz:</b>		<b>Programm:</b>	
PCR-Produkt:	0,25 µl	Denaturierung:	96°C, 10s
Primer:	0,5 µl	Primerannealing:	55°C, 30s
Big Dye:	1,0 µl	Elongation:	60°C, 4min
Aqua bidest.:	<u>8,25 µl</u>	Kühlung:	8°C
	10,0 µl		25 Zyklen

Zur Sequenzierung wurden die Proben in das Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts nach Berlin verschickt und dort im automatisierten ABI Prism 377 DNA Sequenzer mittels Kapillargelelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt. Die Analyse der Traces fand mit Hilfe des Programms TraceEditPro statt. Ein Datenabgleich über die Internetdatenbank [www.mlst.net](http://www.mlst.net) wurde ebenfalls durchgeführt. Bereits typisierte Isolate wurden in die weiteren Analysen dieser Arbeit einbezogen.

#### 4.6. spa-Typisierung

Für die Untersuchung der Proben wurde nach dem Protokoll von *Harmsen et al.*, 2003 gearbeitet [101]. Zuerst wird hierbei eine Amplifizierung der jeweiligen DNA-Fragmente mittels PCR durchgeführt. Hierzu werden „ready-to-go“ PCR-Beads verwendet. Es handelt sich hierbei um kleinste Reagenzgefäße (tubes), die mit bestimmten Nährmedien, PCR-Primer und Enzym bestückt sind. Die jeweiligen Proben (RNA oder DNA) müssen nur noch hinzugegeben werden.

<b>Ansatz:</b>		<b>Programm:</b>	
Aqua bidest:	23,75 µl	Denaturierung:	94°C, 30s
Primer (10 µM):	je 0,5 µl	Primerannealing:	60°C, 30s
DNA :	<u>0,25 µl</u>	Elongation:	72°C, 4min
	25,0 µl	Kühlung:	8°C
			30 Zyklen

Wie bei allen anderen Verfahren folgt eine Aufreinigung mit dem QIAgen PCR Purification Kit zum Beseitigen überschüssiger Pufferreste. Die PCR-Produkte werden mittels Gelelektrophorese überprüft. Dazu trägt man 1-2 µl des Produkts auf ein 1,4%iges Gel auf und lässt es bei 100 V für 60 min laufen. In die erste Geltasche fügt man einen 100 bp Leiterstandard (NEB) hinzu.

Nach erfolgreicher Amplifizierung werden die Sequenzieransätze vorbereitet. Je PCR-Produkt werden 2 Ansätze a 10 µl pipettiert. Alle genutzten Primer sind in Tabelle 2 im Anhang zu finden.

<b>Ansatz für Prämix:</b>		<b>Programm:</b>	
A. bidest.:	6,5 – 6,75 µl (ad 10 µl)	Denaturierung:	94°C, 30s
Primer (0,8 µM):	2 µl	Primerannealing:	60°C, 30s
Big Dye:	1 µl	Elongation:	72°C, 4min
Zuletzt DNA zugeben:	<u>0,25-0,5 µl (5 ng)</u>	Kühlung:	8°C
	10 µl		30 Zyklen

#### 4.7. SCCmec-Typisierung

Zur Analyse der vorliegenden Isolate wurde eine Multiplex-PCR zur Bestimmung der SCCmec I bis V verwendet [226]. Die DNA-Primer und Bedingungen sind unten aufgelistet. Der PCR-Ansatz für die Bestimmung von SCCmec-Elementen erfolgte mittels Multiplex-PCR unter Verwendung von „ready-to-go“ PCR-Beads:

##### Primermix: (Primerkonzentration 10 $\mu$ M)

$\alpha$ 2/2	1 $\mu$ l
$\alpha$ 3/2	3 $\mu$ l
$\beta$ 2/2-1	3 $\mu$ l
<i>ccrA3f2/ccrA3r</i>	1 $\mu$ l/1 $\mu$ l
<i>spaf/r</i>	3 $\mu$ l/3 $\mu$ l
KDPkf/KDPK2	0,5 $\mu$ l/0,5 $\mu$ l
<i>ccrC6f/ccrC8r/2</i>	3 $\mu$ l/3 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 $\mu$ l
	<hr/>
	25 $\mu$ l

##### Ansatz:

PCR-Beads	
A. bidest:	18,5 $\mu$ l
Primermix:	6,25 $\mu$ l
DNA (~5 ng):	<u>0,25 <math>\mu</math>l</u>
	25,0 $\mu$ l

##### Programm:

Denaturierung:	94°C, 30s
Primerannealing:	55°C, 30s
Elongation:	72°C, 90s
Kühlung:	8°C
	35 Zyklen

Die Multiplex-PCR aller Isolate wurde von C.Cuny, Robert Koch-Institut, Wernigerode, durchgeführt.

#### 4.8. Nachweis sekundärer MSSA

Sekundäre MSSA entstehen nach Verlust der SCCmec-Elemente aus MRSA-Isolaten. Infolgedessen besitzt das entsprechende *S. aureus*-Isolat kein *mecA*-Gen und somit auch keine Resistenz gegen  $\beta$ -Lactame mehr. Dieser Einbau oder Verlust von SCCmec wird durch verschiedene Restriktasen (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*) ermöglicht. In der Literatur gibt es unterschiedliche Meinungen zum Nachweis von sekundären MSSA. Die Autoren diskutieren, ob es möglich ist, solche sekundär entstandenen MSSA-Isolate nachzuweisen. Einige Autoren sind davon überzeugt, dass jeder Ein- und Ausbau von Elementen wie SCCmec sog. Narben bzw. Reste hinterlassen würde [226], [227]. Andere Forschungsgruppen vertreten die Auffassung, dass es möglich ist, SCCmec ohne Reste und Überbleibsel zu entfernen [103], [228]. Im Falle des ST398 konnte eine Besonderheit nachgewiesen werden:

Die Publikation von *Chlebowicz et. al* beschreibt, dass eine Konversion von MRSA zu MSSA *in vivo* möglich ist. Im Falle dieses sekundären MSSA (nachgewiesen bei einem Menschen) war es möglich, SCC*mec*-Reste nachzuweisen [221].

#### 4.8.1. Microarray Analysen

Um eventuell vorhandene SCC*mec*-Reste aufzuspüren, wurden von allen in dieser Arbeit untersuchten MSSA-Isolaten zunächst Microarrays durchgeführt, die eine Vielzahl verschiedener Gene bzw. Abschnitte von unterschiedlichen SCC*mec*-Elementen nachweisen können.

Microarrays sind molekularbiologische 2-D Chips, die es ermöglichen, eine Vielzahl von Genen gleichzeitig in einem einzigen Experiment abzufragen und nachzuweisen. Es ist möglich, mit einer geringen Menge an PCR-Produkt einen schnellen Nachweis von bestimmten Genen durchzuführen. Die PCR-Produkte binden an bestimmten Positionen auf dem Chip und werden durch fluoreszierende Markerstoffe mittels PC-Programmen sichtbar gemacht. In dieser Doktorarbeit wurde das Microarray System von CLONDIAG verwendet. Dazu wurde die bakterielle DNA mittels CLONDIAG StaphyType™ Kit isoliert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration jeder einzelnen Probe gemessen (Messung optische Dichte (OD), A260 Methode). Die in dieser Arbeit überprüften Gene sind in Tabelle 21 im Ergebnisteil dargestellt.

#### DNA - Isolation für Microarray:

- 0,2 ml Lysispuffer zu A2 Tube geben und mischen
- 1 Bakterienkultur einreiben
- 1 Stunde Inkubation bei 37°C
- zum Gemisch 20 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL zugeben
- 10 min bei 56°C inkubieren
- Proben kurz zentrifugieren, 200 µl Ethanol zugeben, 15 s vortexen, zentrifugieren
- Gemisch in Spinsäule pipettieren, bei 6000g für 1 min zentrifugieren
- Säule in sauberes Tube stellen und 500 µl Puffer AW1 zugeben, 1 min bei 6000g zentrifugieren
- Säule in sauberes Tube stellen und 500 µl Puffer AW2 zugeben, 1 min bei 14000g zentrifugieren
- Säule in sauberes Tube stellen und 20 µl Milliporewasser auf die Säule geben
- 2 min bei Raumtemperatur stehen lassen, dann 1 min bei 14000g zentrifugieren

Die weiterführende Bearbeitung der Proben fand statt, wenn die Proben eine DNA-Konzentration von mindestens 50ng/µl aufwiesen. Zu 5 µl DNA wurden 4,9 µl B1 und 0,1 µl B2 des StaphyType™ Kit gegeben. Anschließend durchliefen die Proben das folgende PCR-Programm:

**Programm:**

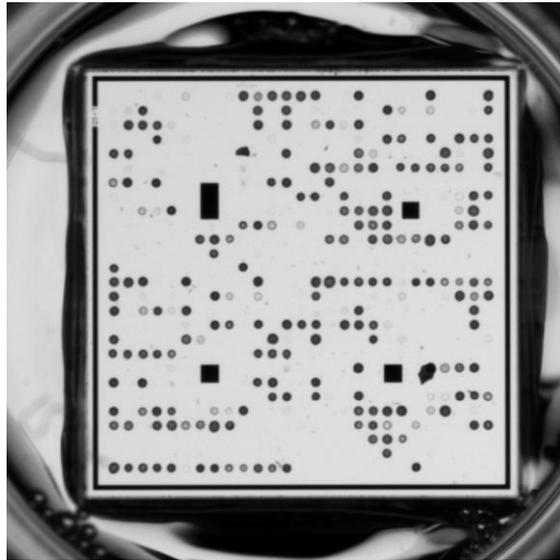
Denaturierung:	96°C, 300 s
Primerannealing:	50°C, 20s
Elongation:	72°C, 30 s
Schluss:	96°C, 20s
Kühlung:	10°C
	45 Zyklen

**Ansatz für Microarray:**

- 90 µl Buffer C1 zu PCR-Produkt geben
- Array-Strip in Rahmen stellen und mit 200 µl Milliporewasser die jeweiligen Kammer 4x spülen
- 200 µl Buffer C1 zugeben
- 2 min bei 55°C und 550 rpm ohne Deckel inkubieren
- C1 verwerfen, danach PCR-Produkte zugeben
- 1 Stunde bei 55°C und 550 rpm mit Deckel inkubieren
- anschließend PCR-Mix aus den Kammern pipettieren
- 3x 200 µl C2 Buffer zugeben und 4x spülen/pipettieren
- in Tube 1 µl C3 und 99 µl C4 mischen
- jeweils 100 µl des Gemischs in eine Arraykammer geben
- 10 min bei 30°C und 550 rpm inkubieren
- Gemisch entfernen
- 2x mit 200 µl C5 Buffer waschen
- 100 µl D1 in jedes Tube füllen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Flüssigkeit entfernen und Array auswerten

Die Auswertung fand mit Hilfe der *ArrayMate Reader Software* von CLONDIAG statt.

Abb. 3: Ergebnisbild der Analyse der DNA des Isolates 08-00360 mittels Microarray



Die Abbildung zeigt den Microarraychip des Isolates 08-00360. Mit Hilfe dieses Chips können innerhalb kurzer Zeit 333 verschiedene Gene auf ihr Vorhandensein im bakteriellen Genom überprüft werden. Dabei ist der Ort jedes Gens auf dem Chip bekannt. Da jedes Gen an einer festgelegten Position hybridisiert, kann das gescannte Bild gerastert und in Segmente (Spots) unterteilt werden. Jedem Spot wird eine Farbe zugewiesen und das Target (Gen) innerhalb jedes Segmentes identifiziert. Ein sehr dunkler Spot zeigt an, dass eine Hybridisierung erfolgreich stattgefunden hat. Die Software misst die unterschiedlichen Lichtsignale und entscheidet je nach Intensität über das Vorhandensein eines Gens.

#### 4.8.2. PCR-Methoden zum Nachweis „sekundärer“ MSSA

Um möglichst viele Informationen über eventuelle SCC*mec*-Reste zu erhalten und die mittels Microarray gewonnenen Ergebnisse zu untermauern, wurden weitere PCR-Methoden durchgeführt. Eine Real-time PCR zur Untersuchung von SCC*mec* in *S. aureus* wurde von *Huletzky et al.* beschrieben [227]. Mit dieser Methode ist es möglich, relativ schnell MRSA direkt aus Nasenproben zu detektieren und diese von KNS zu unterscheiden. Charakteristisch für SCC*mec* sind die Anwesenheit von inverted (umgedreht) und direkten repeats, verschiedenen Rekombinasegenen (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*) sowie des *mec*-Genkomplexes. SCC*mec*-Elemente sind stets an einer spezifischen Stelle (*attB<sub>sc</sub>*) des *S. aureus*-Genoms integriert, welche am 3'Ende eines open reading frames (*orfX*) lokalisiert ist. Fünf verwendete Primer sind spezielle Primer für die SCC*mec right extremity sequences* (SRE). Des Weiteren wurden neue spezifische Primer für die *orfX*-Gen Region benutzt (Bsp.: *Xsau325*). In Isolaten, die *mecA* sekundär verloren haben, ist eventuell noch ein Fragment der „SCC*mec right extremity sequences*“ erhalten oder es ist ein SCC (Staphylococcal cassette chromosome) vorhanden, welches kein *mecA*-Gen enthält. Damit bleiben diese PCRs trotz Verlust des *mecA*-Gens positiv; somit hat man also bei negativer *mecA*-PCR und positiver „SRE-PCR“ den sekundären Verlust nachgewiesen. Die Methode wurde für die SCC*mec* Kassetten I bis IV entworfen und etabliert. In der genannten Publikation wurden Isolate mit SCC*mec* des Typs V, wie sie bei ST398 Isolaten häufig ist, jedoch nicht getestet.

Primermix für Multiplex (Primerkonzentration 10  $\mu$ M):

<i>Xsau325</i>	5'GGATCAAACGGCCTGCACA-3	je 0,25 $\mu$ l
<i>mecii547</i>	5'GTCAAAAATCATGAACCTCATTACTTATG-3	
<i>mecii519</i>	5'ATTCATATATGTAATTCCTCCACATCTC-3	
<i>meciv511</i>	5'CAAATATTATCTCGTAATTTACCTTGTTTC-3	
<i>mecv492</i>	5'CTCTGCTTTATATTATAAAATTACGGCTG-3	
<i>meciiv512</i>	5'CACTTTTTATTCTTCAAAGATTTGAGC-3	

#### Ansatz:

PCR-Beads	
A. bidest:	22,5 $\mu$ l
Multiplex:	1,5 $\mu$ l
DNA (~5 ng):	<u>1,0 <math>\mu</math>l</u>
	25,0 $\mu$ l

#### Programm:

Denaturierung:	96°C, 30s
Elongation:	72°C, 45s
Schluss:	72°C, 10 min
Kühlung:	10°C
	35 Zyklen

Die Ergebnisse einzelner Microarrays wiesen auf das Vorhandensein von Kassettenresten bzw. einer Kasette des Typs V hin. Um zusätzlich Isolate mit Kassettentyp V testen zu können, wurde das Protokoll nach *Chongtrakool et. al* genutzt [103].

Mittels der Primer *IS2* (5'-TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT-3') und *mA2* (5'-AACGTTGTAACCAACCCCAAGA-3') ist es möglich, die Zielregion *IS431-mecA* zu erfassen, welche auch für Typ V beschrieben ist. Das Amplifikat besitzt eine Größe von 2 kb. Im Folgenden sind die Reaktionsbedingungen dargestellt:

<b>Ansatz:</b>		<b>Programm:</b>	
PCR-Produkt:	5,0 µl	Denaturierung	94°C, 30 s
Primermix:	2,0 µl	Annealing	58°C, 30 s
Puffer:	2,5 µl	Elongation	72°C, 90 s
MgCl:	2,0 µl	Schluss	72°C, 10 min
dNTPs:	0,6 µl		30 Zyklen
Taq:	0,1 µl	1,5 % Agarosegel	
Aqua bidest.:	<u>12,8µl</u>	1,3 µl Ethidiumbromid / 100 ml	
	25,0 µl		

Weiterhin wurde die Identifikation von Genen der *ccr*-Region durch zwei unterschiedliche PCR's versucht, um weitere Reaktionen im Microarray zu bestätigen. Eine PCR zur Identifizierung von *ccrA* und *ccrB* wurde durchgeführt. Genutzt wurden dafür die Primer  $\alpha$ , (5'-ATCTATTTCAAAAATGAACCA-3') und  $\beta$ c (5'-ATTGCCTTGATAATAGCCITCT-3') [103]. Die Amplifikatlänge beträgt 560 bp. Als Positivkontrolle diente ein MRSA-Isolat (IMT-Nr.:10017/313) aus der Stammsammlung der Freien Universität Berlin, Fachbereich für Mikrobiologie und Tierseuchen.

<b>Ansatz:</b>		<b>Programm:</b>	
PCR-Produkt:	4,0 µl	Denaturierung	94°C, 5 min
Primer:	je 1,2 µl		94°C, 30 s
Puffer:	5,0 µl	Annealing	54°C, 45 s
MgCl:	2,5 µl	Elongation	72°C, 90 s
dNTPs:	1,0 µl	Schluss	72°C, 10 min
Taq:	0,1 µl		25 Zyklen
Aqua bidest.:	<u>35,0µl</u>	1,5 % Agarosegel	
	50,0 µl	1,3 µl Ethidiumbromid / 100 ml	

Eine weitere PCR diene zur Untersuchung der Zielregion *ccrC*. Um Amplifikate von etwa 520 bp zu erhalten, wurden die Primer *ccr-γF* 5'-CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT-3' und *ccr-γR* 5'-CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT-3' eingesetzt [103]. Hier wurde ebenfalls ein MRSA-Isolat (IMT-Nr.: 6643/ 208) als Positivkontrolle genutzt.

<b>Ansatz:</b>		<b>Programm:</b>	
PCR-Produkt:	4,0 µl	Denaturierung	94°C, 5 min
Primer:	je 1,2 µl		94°C, 30 s
Puffer:	5,0 µl	Annealing	54°C, 90 s
MgCl:	2,5 µl	Elongation	72°C, 90 s
dNTPs:	1,0 µl	Schluss	72°C, 10 min
Taq:	0,1 µl		25 Zyklen
Aqua bidest.:	<u>35,0µl</u>	1,5 % Agarosegel	
	50,0 µl	1,3 µl Ethidiumbromid / 100 ml	

Wie bereits erwähnt, enthalten *SCCmec*-

Elemente verschiedene „Junkyard“-Regionen. Um Unterschiede in diesen Regionen finden zu können, ist es möglich, den „*mec left extremity polymorphism*“ (MLEP) zu untersuchen [103]. Um Amplifikate der Größe von 1 kb, 1,6 kb und 1,7 kb von MLEP zu erhalten, nutzt man die Primer *cR4* (5'-GTTCAAGCCCAGAAGCGATGT-3'), *mR5* (5'-ATGCTCTTTGTTTTGCAGCA-3') und *mR6* (5'-ATATTCTAGATCATCAATAGTTG-3'). Ein positives Ergebnis dieser PCR und das fehlende *mecA* Gen stellen auch hier den Hinweis für mögliche sekundäre MSSA dar.

<b>Ansatz:</b>		<b>Programm:</b>	
PCR-Produkt:	5,0 µl	Denaturierung	94°C, 30 s
Primermix:	1,5 µl	Annealing	54°C, 30 s
Puffer:	2,5 µl	Elongation	72°C, 90 s
MgCl:	2,0 µl	Schluss	72°C, 10 min
dNTPs:	0,6 µl		
Taq:	0,1 µl		30 Zyklen
Aqua bidest.:	<u>14,2µl</u>	1,5 % Agarosegel	
	25,0 µl	1,3 µl Ethidiumbromid / 100 ml	

## 4.9. dHPLC

### 4.9.1. Amplifizierung der ausgesuchten DNA-Fragmente (loci) mittels PCR

Am Anfang dieser Methode steht die Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente aller zu untersuchenden Isolate. Dazu wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) genutzt [229]. Alle in der Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2 im Anhang aufgelistet. Für die PCR wurden Proben mit DNA-Konzentrationen von 15 ng/µl eingesetzt. Diese wurden zuvor im SmartSpec™3000 Spectrometer von Bio-Rad bestimmt.

<b>Ansatz:</b>		<b>Programm:</b>	
Reaktionspuffer (10fach):	2,5 µl	Denaturierung:	96°C, 5min
A.bidest:	16,5 µl		96°C, 30s
Primer 1 (10 mM):	1 µl	Primer-Annealing:	55°C, 45s
Primer 2 (10mM):	1 µl	Elongation:	72°C, 1min
dNTP-Mix		Schluss:	72°C, 5min
(je 2mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP):	2,5 µl		
Template:	1 µl	Kühlung:	8°C
Optimase Polymerase (2.5 U):	<u>0,5 µl</u>		30 Zyklen
	25 µl		

### 4.9.2. Aufreinigung der PCR-Produkte und Nachweis mittels Gelelektrophorese

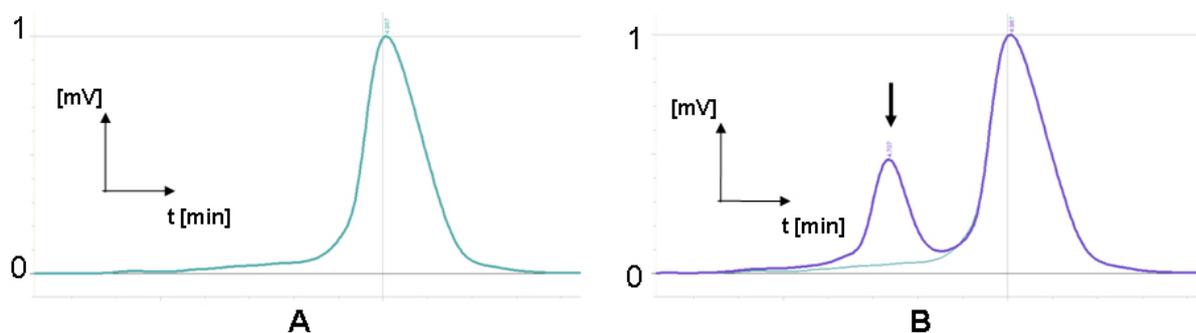
Nach der durchgeführten PCR folgt die Aufreinigung des gewonnenen Produktes, um die Amplifikate von Resten der Polymerase, überschüssigen dNTPs, Salzen und Puffern zu lösen. Dazu wurde das QIAquick PCR Purification Kit genutzt. Anschließend wurden die gereinigten PCR-Produkte in 50 µl aqua bidest eluiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation wurde die DNA in einem 1.5% Agarosegel mit 1xTBE als Elektrophoresepuffer (40mM Tris, 40mM Borsäure, 1mM EDTA, pH 8.3) aufgetrennt und nachfolgend mittels Ethidiumbromidzugabe unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht.

### 4.9.3. Ablauf der dHPLC

Für effektive Zeit- und Kostenersparnisse werden zuerst mehrere Isolate als Multiplexansätze im selben Genlocus mittels dHPLC WAVE™-System untersucht. Multiplexansätze sind Gemische aus 9-10 *S. aureus*-Isolaten und der Referenz-DNA. Eine

Zusammenstellung aller Multiplexansätze gibt Tabelle 3 im Anhang wieder. Zur Herstellung der Multiplexprobenansätze und zur anschließenden Analyse müssen folgende Schritte durchlaufen werden. Zuerst wird das PCR-Amplikon, welches vermisch wird, mit Referenz-DNA, auf 96°C für 5 min erhitzt, um es zu denaturieren. Durch anschließendes langsames Abkühlen auf 12°C können sich die zuerst entstandenen Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen vereinen. Wie bereits vorher beschrieben wurde (siehe Abschnitt 2.4.5.), können dabei Kombinationen der Einzelstränge einzelner Isolate mit der Referenz-DNA entstehen. Danach binden die entstandenen Hetero- und Homoduplices an die Sep®HT Säule. Die Trennung von dieser Säule ist abhängig von einem ganz bestimmten Temperatur- und Flussratengradienten, der mittels Puffer A und B realisiert wurde. Für jedes einzelne Primerpaar mussten diese Optima vor Durchführung der *dHPLC* untersucht und festgelegt werden. Die Werte sind der Tabelle 20 im Anhang zu entnehmen. Abschließend erfasst ein UV-Detektor photometrisch die abgewaschenen DNA-Fragmente. Die Auswertung der Chromatogramme der einzelnen Proben erfolgt mittels der gerätespezifischen Software Navigator™. Werden im Chromatogramm Hinweise auf SNPs in Form von Doppelpicks festgestellt, werden die Multiplexansätze in Simplexansätze geteilt. Das bedeutet, dass jedes Isolat einzeln, mit der Referenz-DNA versetzt, nochmals die *dHPLC*-Methode durchläuft. Auf diesem Wege können die genotypisch unterschiedlichen Isolate detektiert werden. Bei Vorhandensein eines SNPs zeigt das Chromatogramm meist zwei deutliche Peaks (siehe Abb. 4). Es kann aber auch eine zusätzliche Schulter vorkommen, die auf die Anwesenheit von Heteroduplices hinweist, und somit auf eine Sequenzvariante hindeutet. Die betreffenden Mutationen werden anschließend durch gezielte DNA-Sequenzierung ermittelt.

Abb. 4: Schmelzkurvenanalyse eines Einzelisolates und im Vergleich dazu die Überlagerung eines zweiten Isolates mit Vorhandensein eines SNPs



Die Abbildung zeigt den Schmelzkurvenverlauf der DNA eines Isolates (A), beispielsweise des Referenzstammes in Abhängigkeit von Zeit ( $t[\text{min}]$  = Zeit in Minuten) und der Peakhöhe ( $\text{mV}$  = milliVolt). Betrachtet man B, sieht man überlagerte Kurven der DNA zweier Isolate, die sich in mindestens einem Genlocus unterscheiden und von denen ein Isolat einen SNP aufweisen sollte.

#### 4.9.4. Sequenzierung mittels Big Dye®Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit

Um die mittels *dHPLC*-Technik detektierten Einzelnukleotidpolymorphismen in den ausgewählten Loci nachweisen zu können, werden Sequenzierungen der einzelnen Abschnitte gemacht. Diese werden nach dem Didesoxynukleotid Kettenabbruchverfahren nach *Sanger et al.* durchgeführt [230]. Dazu wurde das jeweilige PCR-Produkt direkt aus den Multiplexplatten pipettiert und amplifiziert.

<b>Ansatz:</b>		<b>Programm:</b>	
Template:	1 µl	Denaturierung:	96°C, 5min
Puffer Y:	2,5 µl		96°C, 30s
dNTPs (10mM):	0,5 µl	Annealing:	55°C, 45s
Primer F/R:	2 µl	Elongation:	72°C, 1min
A. bidest.:	18,87 µl	Schluss:	72°C, 5min
Taq Polymerase:	<u>0,13 µl</u>	Kühlung:	8°C
	25 µl		30 Zyklen

Anschließend wurden die Produkte erneut mittels QIAgen PCR Purification Kit gereinigt, um dann die Reaktionsansätze der ausgewählten Loci mittels Big Dye®Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit zu pipettieren.

<b>Ansatz:</b>		<b>Programm:</b>	
Template:	1 µl	Denaturierung:	96°C, 10s
A. bidest.:	7,5 µl	Annealing:	50°C, 5s
Primer (10mM):	0,5 µl	Elongation:	60°C, 4 min
Big Dye:	<u>1 µl</u>	Kühlung:	4°C
	10 µl		25 Zyklen

Die Auftrennung erfolgte im Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts in Berlin. Nach erneuter Aufreinigung über eine Sephadexsäule zur Entfernung von Big Dye Resten, Primern und Salzen werden die Proben im automatisierten *ABI Prism 377* DNA Sequenzer mittels Kapillargelelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt. Die DNA-Sequenz wird durch Messung der vier verschiedenen Fluoreszenzfarben (Big Dye) ermittelt.

#### 4.9.5. Datenanalyse

Die Auswertung aller Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software *LaserGene*. Die Allelvarianten unterschiedlicher Isolate wurden untereinander angezeigt, so dass ein schneller Sequenzvergleich und ein Herausfiltern einzelner Nukleotidunterschiede möglich ist. Wenn Einzelnukleotidpolymorphismen gefunden wurden, sind diese über das jeweilige Elektropherogramm überprüft worden. Ein Vergleich mit dem gewählten Referenzgenom (N315) und die Ermittlung der Position der Variante fand durch einen Datenabgleich mittels *blastn* über die NCBI Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table)) statt.

Anschließend erfolgte die Erstellung eines Minimum-Spanning-Trees (MST) mit Hilfe der Software Bionumerics 6.0. Der Minimum-Spanning-Tree-Algorithmus erlaubte es, Kurzzeit-Unterschiede und Mikroevolution in Bakterienpopulationen zu rekonstruieren. Die Sequenzen und Einzelnukleotidpolymorphismen wurden dafür in eine BioNumerics-Datenbank importiert. Dabei wurde gemäß Version 6.0 des Benutzerhandbuches vorgegangen. Basierend auf den gefundenen Sequenzunterschieden erstellte das Programm einen Baum, welcher die Summe der kleinstmöglichen Abstände der Isolate widerspiegelt und die phylogenetischen Verbindungen einzelner Haplotypen erkennen lässt. Zur Analyse der Parameter Nukleotiddiversität, Nukleotidvariation und des Verhältnisses von Synonymen zu Nicht-synonymen Basensubstitutionen erfolgte eine Konkatenierung (Verknüpfung) aller Sequenzen. Die Berechnung der genannten Parameter wurde mittels *DnasP*-Analyse mit der gleichnamigen Software ausgeführt.

Um Populationsgrößen abschätzen zu können, ist es möglich, mit Hilfe der Software *BEAST* demographische Analysen durchzuführen. Die Software analysiert molekulare Sequenzen und arbeitet auf der Grundlage des *Bayesianischen* Verfahrens [231, 232]. Dazu werden die *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) Algorithmen verwendet. Diese Klasse von Algorithmen nutzt man, um zufällige Stichproben aus Wahrscheinlichkeitsverteilungen zu simulieren. Mit Hilfe dieser Methoden ist es möglich, Abweichungen zu kalkulieren und die Demographie der Bakterien zurückzuverfolgen bzw. zu rekonstruieren [231].

## 4.10. Transmissionsstudie

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde als Teilprojekt eine Longitudinalstudie zur Variation verschiedener Genotypen von CC398-*S. aureus* auf Farmlevel erstellt. Dabei wurden insgesamt 27 Isolate von Landwirten sowie deren Familienangehörigen und/oder Mitarbeitern sowie Schweinen des Betriebes zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Ziel dieser Untersuchung war es zusätzlich Einblicke in mögliche Transmissionsvorgänge in individuellen Betrieben zu erlangen. Alle hier beschriebenen Isolate wurden mittels *dHPLC*-Methode untersucht und sind Bestandteil der genannten Ergebnisse und des Minimum-Spanning-Tree-Modells. Alle weiteren Isolatedaten lagen bereits vor der Promotionsarbeit im Robert Koch-Institut vor. Ursprünglich sollten Isolate von fünf verschiedenen Betrieben in die Studie aufgenommen werden. Nach ersten Vorversuchen und Ergebnissen wurden jedoch drei dieser Betriebe auf Grund fehlender Nachfolgeproben und Informationen ausgeschlossen. Für die verbliebenen zwei Betriebe (Betrieb 2 und 3) lagen genügend Isolate (17) und Informationen vor, so dass diese genauer analysiert werden konnten.

Betrieb 2 ist eine Schweinemastanlage, die mit Jungtieren aus Deutschland und Dänemark beliefert wird und diese aufzieht. Es handelt sich um eine aus mehreren Einheiten bestehende Anlage in Sachsen-Anhalt. Es war zweimal möglich, Proben des Landwirts, zweier unterschiedlicher Mitarbeiter der Anlage und von verschiedenen Schweinen zu untersuchen. Betrieb drei ist ein eher kleiner, Schweinehaltender Hof. In diesem Fall konnten zu drei verschiedenen Zeitpunkten Proben des Landwirtes selbst und seiner Tiere genommen werden. Alle Proben wurden durch Dr. Ch. Cuny direkt auf der Anlage gewonnen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Isolate

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 112 *S. aureus*-Stämme (94 MRSA und 18 MSSA) des klonalen Komplexes CC398, die aus Proben von unterschiedlichen Tierarten und dem Menschen stammen, auf das Vorhandensein von Einzelnukleotidpolymorphismen in 105 Haushaltsgenen (siehe Tabelle 20) [110], untersucht. Alle Isolate stammen aus verschiedenen geografischen Regionen und Stammsammlungen. Ziel der Stammauswahl war es, ein möglichst breites Spektrum unterschiedlicher Herkunftsländer, Isolationsorte und Wirte abzubilden. Einige Isolate stammen aus Ausbruchsgeschehen, andere sind beliebig zusammengestellt worden. Alle bekannten Daten dieser Isolate sind in Tabelle 11 (unter 3.1.) dargestellt. Die für diese Untersuchung benötigten Primer lagen bereits im Robert

Koch-Institut vor (siehe Tabelle 20) [110]. Fünf Primer mussten von den Untersuchungen ausgeschlossen werden, da auch nach mehrmaligen Versuchen keine Bindung an die DNA stattfand. Insgesamt konnten 41.199bp (basepairs, engl. Basenpaare) untersucht werden. Auf das Gesamtgenom von *S. aureus* bezogen stellt das einen Anteil von ca. 1,5 % dar. Alle Isolate wurden im Robert Koch-Institut auf Blutagar angezüchtet. Anschließend fand die Speziesdiagnostik wie oben beschrieben statt (siehe Abschnitt 4.1. und folgende). Zur weiteren Untersuchung sowie Typisierung gehörten die Resistenzbestimmung, die Spezifizierung des *spa*-Typs und der *SCCmec*-Elemente. Einzelne Isolate wurden mittels MLST untersucht. Ausgewählte Isolate wurden mittels PFGE analysiert. Wie bereits erwähnt wurden die Isolate in Multiplexansätzen mit jeweils 9 bis 10 Proben für den entsprechenden Locus untersucht. Beim Auftreten von Heteroduplexformationen der Schmelzkurven wurden von den betreffenden Isolaten einzelne Simplexanalysen durchgeführt, um so Einzelnukleotidunterschiede zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden so in etwa 1300 Multiplexreaktionen circa 350 Heteroduplexe gefunden. Weiterhin waren etwa 3500 Simplexreaktionen notwendig, um SNPs zu detektieren. Bei 34 der insgesamt 112 untersuchten Isolate konnte ein sicherer Zusammenhang zu einer Infektion/Hospitalisierung beobachtet werden. Bei 11 Isolaten ist der Ursprung unbekannt und es gibt zu ihnen keine weiteren bereitgestellten Daten. Die weiteren 67 Isolate stammen von besiedelten Menschen und/oder von Tieren und deren Umgebung. Ein großer Teil der Isolate beherbergt *SCCmec* IV (25 Isolate) und V (64 Isolate). Weiterhin hat man ein Isolat mit *SCCmec*-Element III gefunden sowie vier Isolate, die zum Zeitpunkt der Laboruntersuchungen dieser Doktorarbeit (2010) noch nicht typisierbar waren (NT). Neben 94 MRSA-Isolaten wurden 18 MSSA in die Arbeit aufgenommen. Bei der Verteilung der *spa*-Typen sind insgesamt neun unterschiedliche *spa*-Typen vertreten. A

Am häufigsten kommt t011 (54) vor, gefolgt von t034 (43). Außerdem konnten in dieser Studie vier Isolate mit dem *spa*-Typ t571, jeweils drei Isolate mit dem *spa*-Typen t108, zwei Isolate mit dem *spa*-Typen t899, t1197, t1457 und jeweils ein einzelnes Isolat mit dem *spa*-Typen t1344 und t2974 gefunden werden. Bis auf drei MSSA-Isolate (06-03005, 07-01429, 07-01826) waren alle untersuchten Stämme resistent gegen Penicillin. Insgesamt 12 Isolate wiesen Resistenzen gegen maximal zwei Antibiotika auf.

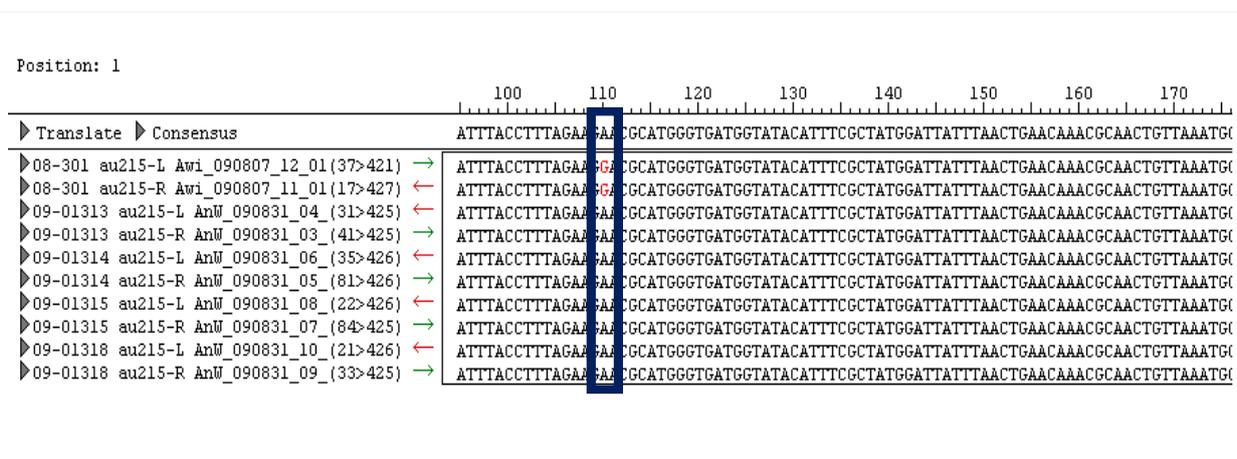
Alle anderen Isolate besaßen Resistenzen gegen mehr als zwei Antibiotika. Am häufigsten waren Resistenzen gegen Penicillin, Oxacillin, Tetrazyklin, Gentamycin und Erythromycin vorhanden.

## 5.2. Nachweis und Analyse der Einzelnukleotidunterschiede

Alle Loci, in denen SNPs detektiert werden konnten, wurden sequenzanalysiert. Die Auswertung aller Sequenzdaten fand mit Hilfe der Software *LaserGene*® statt. Es wurde für jeden einzelnen Locus zum Vergleich miteinander ein Sequenzalignment der jeweiligen erfolgreich untersuchten Isolate und des Referenzstammes gemacht. Die Alignments konnten anschließend auf das Vorhandensein von Sequenzunterschieden geprüft werden. Korrekt identifizierte SNPs in den jeweiligen Sequenzen wurden gegen die *NCBI* Datenbank gelastet. In dieser Datenbank sind alle bereits vollständig sequenzierten Genome von *S. aureus* hinterlegt und ein Vergleich der Sequenzdaten ist sehr schnell und einfach möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Sequenzdaten mit den hinterlegten Daten der *S. aureus*-Genome von N315 (CC5), NCTC 8325 (CC8), MW2 (CC1), RF122 (CC151), sowie JH1 und JH9 (beide CC5) abgeglichen. Anfang 2010 wurde erstmals ein vollständiges Genom für ein Isolat des CC398 veröffentlicht [233]. Alle untersuchten Loci wurden ebenfalls mit dieser Genomsequenz (SO385) verglichen, wobei gleiche und zusätzliche Unterschiede erfasst und in der Datenbank ergänzt wurden.

Die Vergleiche mit hinterlegten Sequenzen sind nötig, um die eigenen Sequenzen zu prüfen und um die verwandtschaftlichen Beziehungen der verschiedenen klonalen Komplexe zu erfassen und dann mittels MST sichtbar zu machen (siehe Abb. 5).

Abb. 5: Alignment für ausgesuchte Isolate und den Referenzstamm für den Locus 215



Die Abbildung 5 zeigt ein Alignment mehrerer Isolate und des Referenzstammes für den Locus 215. Es ist zu erkennen, dass in Position 110 ein Sequenzunterschied aller Isolate zum Referenzstamm vorhanden ist (G→A).

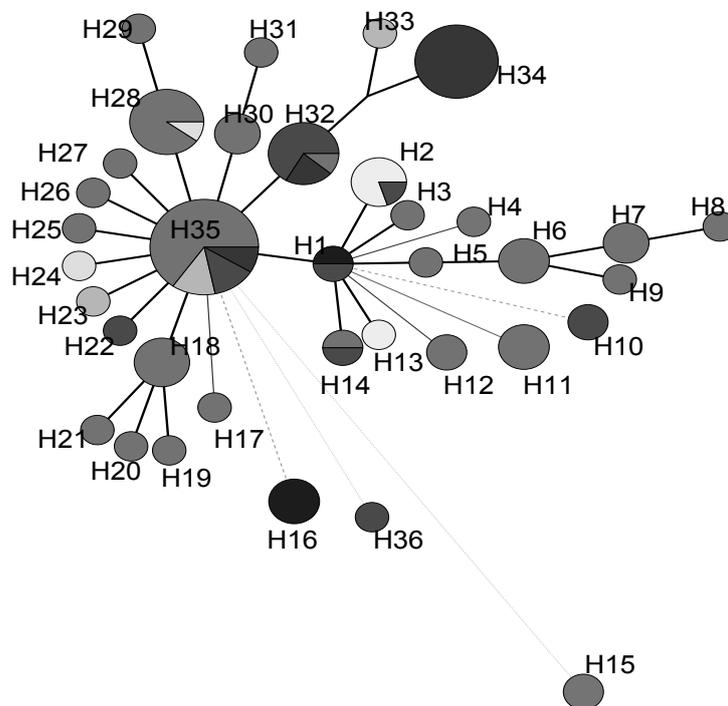
Alle so gefundenen SNPs wurden in eine Bionumerics Datenbank eingetragen und die jeweiligen Sequenzen dort hinterlegt. Innerhalb der pro Isolat untersuchten 100 Loci konnten für die 112 Isolate (=11,200 Loci) zuzüglich des publizierten Genoms 60 SNPs gefunden werden. Grundsätzlich lassen sich hier zwei Ursachen von Mutationen unterscheiden: die Transition und die Transversion [234]. Handelt es sich um eine Transition, so wird der Charakter der Nukleobase erhalten, es kommt hierbei nur zu einem Austausch von Purin-Pyrimidin-Basenpaaren (z.B. das Paar G-C durch A-T). Im Gegensatz dazu werden bei Transversionen die Purinbasen gegen Pyrimidinbasen oder umgekehrt ersetzt. Transitionen setzen nur einen einfachen chemischen Reaktionsschritt (Desaminierung) voraus und treten damit häufiger als Transversionen auf, bei denen zunächst die Base komplett entfernt werden muss (Depurinierung zur Apurinsäure). Zusätzlich zu den genannten Mutationen können Deletionen oder Insertionen auftreten. Eine Deletion ist eine Variante der Genmutation, bei der ein Nukleotid oder eine Nukleotidsequenz fehlt. Bei der Insertion kommt es zur zusätzlichen Aufnahme von genetischem Material, einzelnen Nukleotiden oder ganzer Nukleotidsequenzen. Innerhalb der 60 gefundenen Einzelnukleotidunterschiede wurden 41 Transitionen, 18 Transversionen und eine Deletion detektiert (siehe Tabelle 16).

### **5.3. Phylogenetische Analysen**

#### **5.3.1. Minimum-Spanning-Tree**

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse und zur Beurteilung der evolutionsgeschichtlichen Zusammenhänge wurde das Modell des Minimum-Spanning-Trees (MST) zu Hilfe genommen. Dieses Modell basiert auf den Einzelnukleotidpolymorphismen in den untersuchten Genfragmenten der selektierten Genloci. Erstellt wurden alle MST-Modelle mit dem Softwareprogramm *Bionumerics* 6.0. Dabei baut das Programm den MST so auf, dass die Summe der Intervalle zwischen den einzelnen SNPs minimiert wird. Alle Isolate, die im Zeitraum zwischen 2004 und 2009 isoliert wurden, werden nach ihren genomischen Unterschieden in verschiedene Gruppen geclustert. Ein Cluster ist ein Muster und stellt hier eine als ein einheitliches Ganzes zu betrachtende Menge von Isolaten dar. Cluster werden i von genetisch ähnlichen und gleichen Isolaten gebildet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte aus den 112 Isolaten und einem publizierten, vollständig sequenzierten Genom von CC398 (SO385) ein MST mit 36 verschiedenen Haplotypen basierend auf 60 SNPs erstellt werden (siehe Abbildung 6).

Abb. 6: MST Haplotypen; Der MST spiegelt die Verteilung der verschiedenen Haplotypen (H1-H36) wider, dabei sind die Kreise proportional zur Anzahl der enthaltenen Isolate und die Striche proportional zur Anzahl der SNPs zwischen diesen Isolaten.



Die Haplotypen sind als Knoten bzw. Kreise im Baum sichtbar. Sie enthalten jeweils mindestens ein Isolat. Die Anzahl der enthaltenen Isolate ist proportional zur Größe des Kreises. Zwei verschiedene Haplotypen werden durch einen Strich verbunden, wobei die Länge der Striche ebenfalls proportional zur Anzahl der gefundenen SNPs ist. Allen Haplotypen wurde eine entsprechende Nummer zugeordnet (siehe Tabelle 15). Es war möglich, die potentielle Wurzel („root“) des Baumes durch den Vergleich aller SNPs mit den jeweiligen Sequenzen der bereits erwähnten, vollständig sequenzierten Genome zu ermitteln (*blastn*). Somit wird ein hypothetischer Punkt oder Knoten festgelegt, welcher durch die Isolate repräsentiert wird, die die höchste genetische Übereinstimmung der hier untersuchten Genloci im Vergleich mit bereits publizierten Genomen besitzen. Die Wurzel wird durch den Haplotypen 1 (H1) repräsentiert und enthält zwei Isolate. Alle untersuchten Loci dieser zwei Isolate wiesen die höchste Übereinstimmung mit allen bereits publizierten Genomen auf und haben insgesamt nur zwei Sequenzunterschiede zu dem von uns gewählten Referenzstamm 08-00301. Dieses Referenz-Isolat wurde als Haplotyp 28 definiert. Neun weitere Isolate konnten im Zuge der Analyse diesem H28 zugeordnet werden.

Um soviel Daten zur Phylogenie dieses Sequenztyps wie möglich zu erhalten, kann man den MST mit Daten zur geographischen Herkunft der Isolate, den *spa*-Typ, dem zugehörigen SCC*mec*-Typ oder der jeweiligen Spezies des beprobten Individuums abgleichen.

### 5.3.2. Phylogeographie

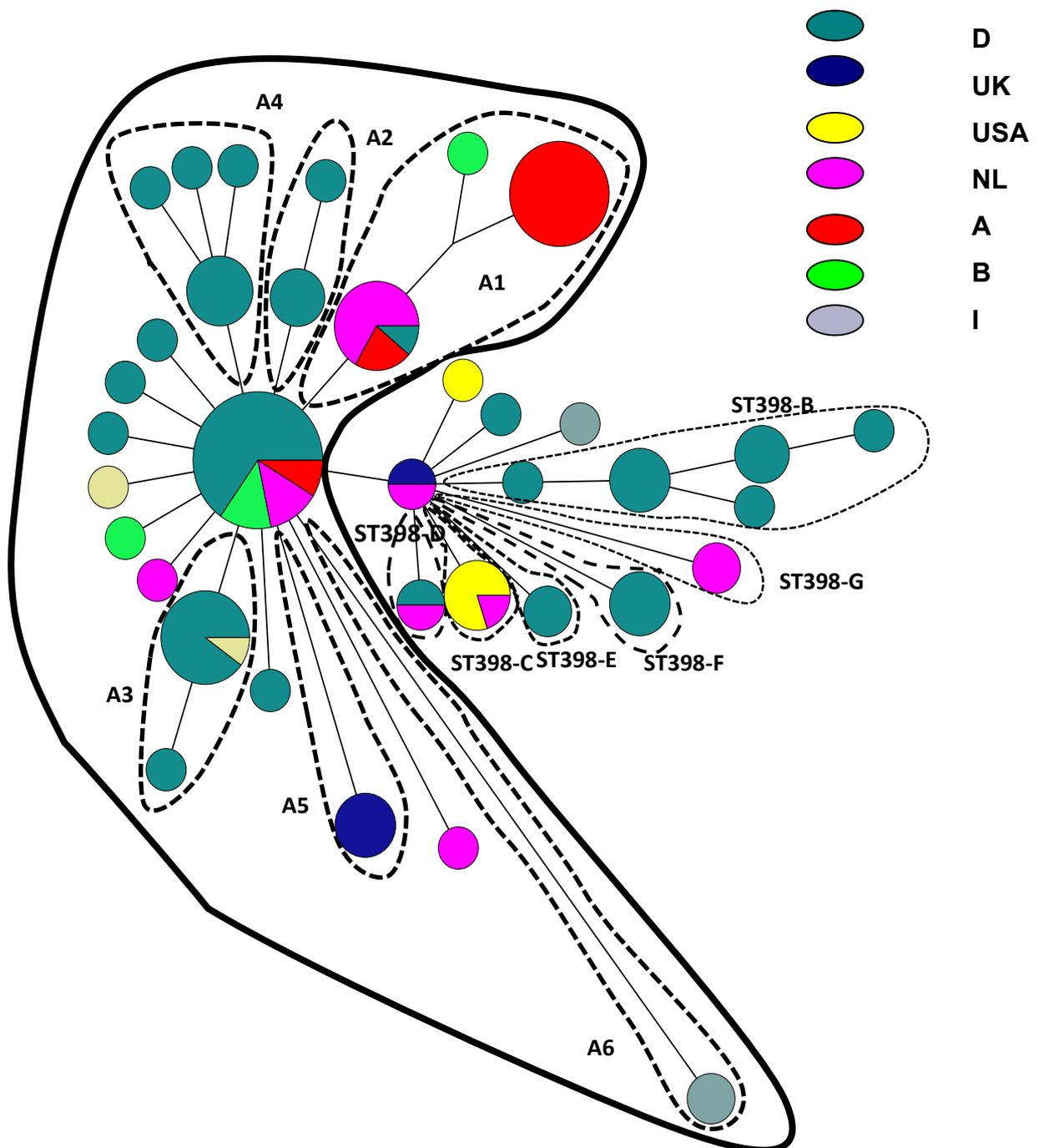
Unter Zuhilfenahme von Informationen zur geographischen Herkunft der Isolate wurde ein MST erstellt, in dem sieben Sublinien (**ST398-A bis ST398-G**) unterschieden werden können. Ausgehend von der Wurzel (H1), kann man die vorhandenen Haplotypen in Sublinien einteilen. Diese Sublinien haben sich genetisch unterschiedlich entwickelt. Sie spiegeln somit die maximale Anzahl von SNPs, mit denen eine Gruppe von Haplotypen, ausgehend von der Wurzel zusammengefasst wird, wider. Der größte Teil aller Isolate (82) kann in der Sublinie **ST398-A** gefunden werden. Diese enthält Isolate aus Deutschland, Österreich, den Niederlanden, Belgien, Italien und dem Vereinigten Königreich. Da sehr viele Isolate und teilweise sehr große Cluster in dieser Sublinie enthalten sind, wurden für eine bessere Übersichtlichkeit und Besprechung der Linien die Cluster mit mehr als zwei Isolaten nochmals unterteilt in sechs monophyletische Untergruppen (**ST398-A1 bis ST398-A6**). Monophyletische Untergruppen begründen sich auf genetischen Unterschieden die im Vergleich zum Vorfahren der jeweils betrachteten Stammlinie neu erworben wurden (abgeleitet). Alle SNPs der einzelnen Sublinien und monophyletischen Untergruppen sind in Tabelle 16 aufgeschlüsselt. Die Sublinie **ST398-A** (1 SNP zur Wurzel) mit ihren monophyletischen Untergruppen liegt auf der linken Seite der Wurzel, alle anderen Sublinien findet man rechts der Wurzel. Wie die Analyse zeigt, sind Isolate mit ähnlichem geographischen oder epidemiologischen Hintergrund in gleichen oder eng benachbarten Sublinien zu finden. Die Untergruppe **ST398-A1** (5 SNPs zur Wurzel) enthält 3 Haplotypen (H32, 33 und 34) aus 23 Isolaten. Gemeinsam ist allen das Vorhandensein des *SCCmec* Elements IV. Außerdem besitzen sie den *spa*-Typen t034. Der Haplotyp H32 setzt sich aus niederländischen, österreichischen und deutschen Isolaten zusammen. Er besteht aus Isolaten, die von 5 Pferden, 2 Hunden, 2 Rindern und einem Schwein stammen. Der Haplotyp H33 wird durch ein einzelnes Isolat (Pferd) aus Belgien gebildet. Der Haplotyp H34 besteht aus Isolaten, die von exponierten Personen (Personal) sowie Pferden einer Pferdeklinik in Wien stammen. Ein epidemiologischer Zusammenhang ist gegeben und nachvollziehbar [28]. Die Untergruppe **ST398-A2** ((3 SNPs zur Wurzel), (H30, H31)) besteht aus einem Krankenhausisolat und 3 Isolaten, welche von Schweinen und ihrem zugehörigen Besitzer einer deutschen Schweinemastanlage entnommen wurden. Die Untergruppe **ST398-A3** ((3 SNPs zur Wurzel) (H28, H29)) setzt sich ausschließlich aus Isolaten von Schweinen und Menschen (Landwirt oder dazugehöriges Personal) einer zweiten deutschen Schweinemastanlage. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen (siehe Tabelle 16). Betrachtet man die Untergruppe **ST398-A4** (5 SNPs zur Wurzel), findet man 5 Isolate im Haplotypen H18. Diese Isolate stammen von deutschen Landwirten oder deren Familien. Die Isolate der Haplotypen H19 und H21 stammen ebenfalls von Personen

aus Deutschland. Das Isolat zum Haplotypen H20 stammt aus einem deutschen Krankenhaus. Auf die epidemiologischen Zusammenhänge der Untergruppen **ST398-A2**, **-A3** und **-A4** wird in der Besprechung der Ergebnisse der Transmissionsstudie näher eingegangen. Es wird deutlich, dass die Isolate der Landwirte, des Personals und der zugehörigen Schweine eng verwandte Genotypen aufweisen, welche auch in den jeweiligen Sublinien vertreten sind. Die Untergruppe **ST398-A5** (5 SNPs zur Wurzel) wird von vier Isolaten aus einem Krankenhaus des Vereinigten Königreichs (Glasgow) gebildet. Drei der Isolate entstammen aus humanen Wundinfektionsprozessen, und ein weiteres Isolat wurde in der Umgebung des Patienten nachgewiesen. Zwei Isolate aus Infektionsprozessen von italienischen Landwirten bilden die Untergruppe **ST398-A6** (11 SNPs zur Wurzel). Das publizierte ST398-Genom eines Menschen ordnet sich ebenfalls in die große Sublinie ST398-A ein und entstammt einem Infektionsprozess. Es ist gekennzeichnet als **SO385** ((6 SNPs zur Wurzel), (H36)).

Die eng an der Wurzel gelegenen Haplotypen (**ST398-B bis ST398-G**) bilden in den meisten Fällen geographisch homogene Cluster. Es sind allerdings keine epidemiologischen Zusammenhänge bekannt. Die Sublinie **ST398-B** (5 SNPs zur Wurzel) besteht aus 10 deutschen Isolaten. Dabei stammen mehrere Isolate von Schweinen und exponierten Landwirten. Außerdem sind Isolate aus Infektionsprozessen aus deutschen Krankenhäusern, einer Umgebungsuntersuchung sowie ein CC398-Isolat einer Katze enthalten. Die Sublinie **ST398-C** (1 SNP zur Wurzel) wird repräsentiert durch Isolate von Menschen und Schweinen aus dem mittleren Westen der USA (Iowa) sowie einem niederländischen Isolat, das aus einem Hund isoliert wurde (Haplotyp H2). Auch in der Sublinie **ST398-D** (1 SNP zur Wurzel) findet sich ein niederländisches Isolat wieder. Es handelt sich um einen positiven Nachweis von *S. aureus* CC398 bei einer Ziege. Zusammen mit einem Isolat aus einem deutschen Krankenhaus bilden beide die genannte Sublinie. In der Sublinie **ST398-E** (2 SNPs zur Wurzel) findet man 2 deutsche Isolate aus 2 Krankenhäusern. Aus Infektionsprozessen von deutschen Puten unterschiedlicher Anlagen stammen die 4 Isolate der Sublinie **ST398-F** (4 SNPs zur Wurzel). Die Sublinie **ST398-G** (3 SNPs zur Wurzel) besteht aus 2 niederländischen Isolaten, welche von Schweinen stammen. Ob beide derselben Anlage entstammen, ist den gegebenen Informationen nicht zu entnehmen. Auffallend oft findet man Isolate aus den Niederlanden in den Haplotypen wieder (Haplotyp H1, H2, H14, H32 sowie H35). Sie clustern häufig zusammen mit Isolaten anderer Länder in den jeweiligen Genotypen. Zusammenfassend kann man feststellen, dass verschiedene Haplotypen in allen genannten Ländern zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgetreten sind und dass diese eventuell einen niederländischen Ursprung besitzen könnten.

Abb. 7: *Minimum Spanning Tree* in Korrelation mit der Phylogeographie aller Isolate

Der MST beschreibt sieben Sublinien (ST398 A-G) zur geographischen Verteilung der Isolate. Jeder Kreis stellt einen anderen Haplotypen dar. Die Farben der Kreise repräsentieren das Land aus dem das Isolat stammt. Deutschland (D) ist dunkelgrün, Vereinigtes Königreich (UK) dunkelblau, Vereinigte Staaten von Amerika (USA) gelb, die Niederlande (NL) pink, Österreich (A) rot, Belgien (B) grün und Italien ist grau dargestellt. Innerhalb der großen Sublinie ST398-A existieren monophyletische Untergruppen (A1-A6).



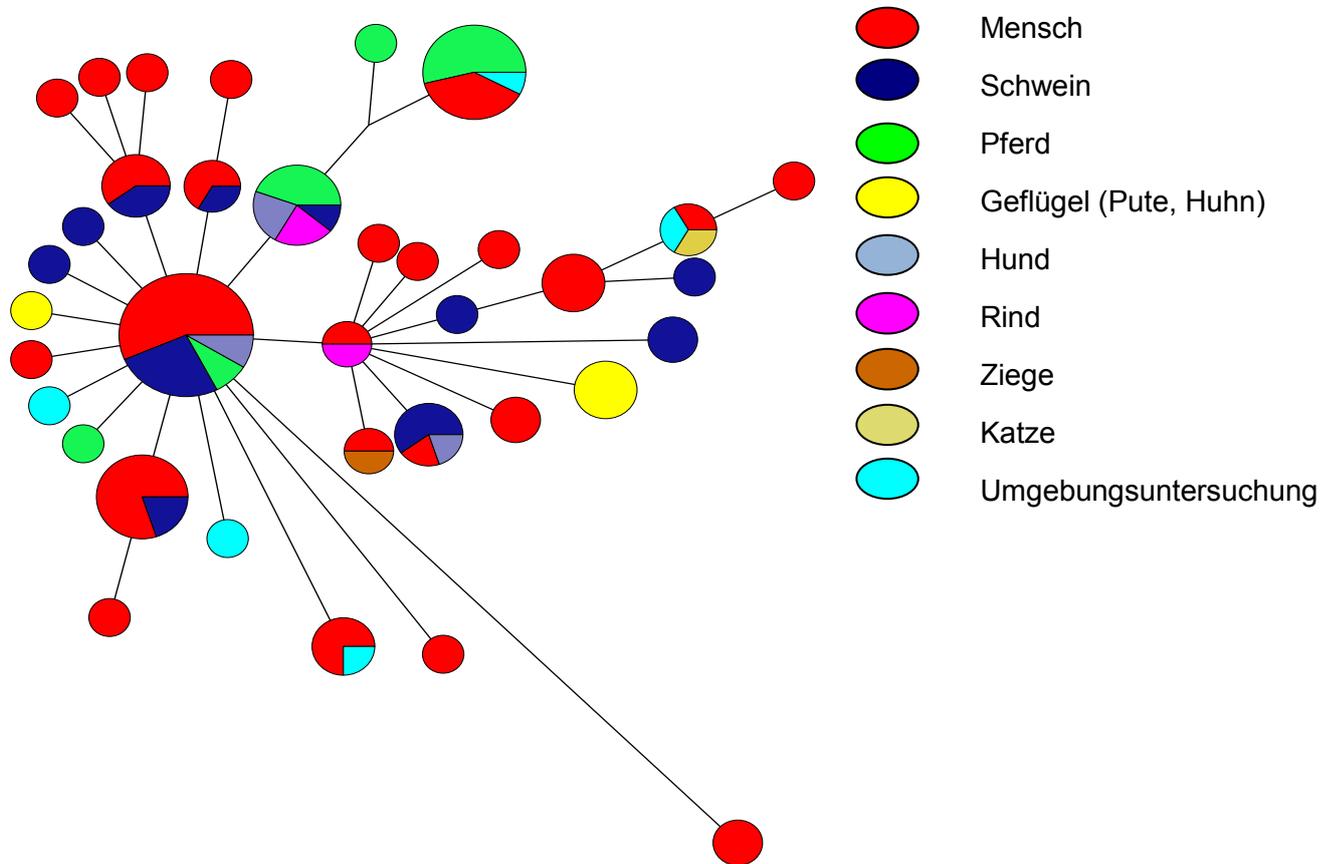
Tab. 16: Auflistung der Sublinien u. monophyletischen Untergruppen, einschließlich ihrer SNPs

<b>Sublinie</b>	<b>SNP-Anzahl zur Wurzel</b>	<b>Locus</b>	<b>SNPs innerhalb der Untergruppe</b>	<b>Locus</b>
ST398-A	1	289-1	-	
ST398-A1	1	289-1	4	309-2, 298-1, 234-1, 232-1
ST398-A2	1	289-1	2	291-1, 300-2
ST398-A3	1	289-1	2	200-1, 279-2
ST398-A4	1	289-1	4	261-1, 269-1, 265-1, 252-2
ST398-A5	1	289-1	4	244-1, 215-1, 215-2, 237-1
ST398-A6	1	289-1	10	200-2, 200-3, 201-1, 201-2, 201-3, 202-1, 202-2, 202-3, 202-4, 202-5
SO385	1	289-1	5	203-1, 244-2, 278-1, 278-2, 278-3
ST398-B	5	251-1, 239-4, 309-1, 279-1, 300-1	-	
ST398-C	1	201-4	-	
ST398-D	1	209-1	-	
ST398-E	2	230-1, 223-7	-	
ST398-F	4	243-1, 264-1, 286-1, 304-1	-	
ST398-G	3	252-1, 212-1, 208-1	-	

Die Tabelle gibt die beschriebenen Sublinien und monophyletischen Untergruppen wieder. Zusätzlich wurden die Anzahl der SNPs, ausgehend von der Wurzel, sowie die Namen der Loci, in denen der jeweilige SNP auftrat, angegeben.

### 5.3.3. Wirtsspezifität

Abb. 8: MST in Korrelation mit der Verteilung der Spezies aller Isolate



Die Abbildung zeigt die Verteilung der Wirtsspezies innerhalb des MST. Humane Isolate sind rot gekennzeichnet, porcine Isolate blau, equine Isolate grün, aviäre Isolate gelb, canine Isolate taubengrau, bovine Isolate pink, caprine Isolate braun, feline Isolate hellbraun und Isolate aus Umgebungsuntersuchungen sind hellblau dargestellt.

Um zu prüfen, ob innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten CC398-Isolate Wirtsspezifität nachgewiesen werden kann, wurden sowohl humane Isolate (57) als auch Isolate verschiedener Tierspezies (51) und 4 Isolate aus Umgebungsproben untersucht (siehe Tabelle 15). Die Verteilung von Isolaten verschiedener Tierspezies war nicht ausgeglichen und es wurde von allen Spezies eine unterschiedliche Anzahl an Isolaten einbezogen. Dabei handelt es sich um 21 Isolate von nasal besiedelten Schweinen, 15 Isolate von Pferden, 5 Isolate von Hunden, 5 Isolate von Puten, 3 Isolate von Rindern und jeweils ein Isolat einer Katze und einer Ziege. Im MST sind immer wieder Haplotypen vorhanden, in denen sowohl menschliche als auch tierische Isolate vertreten sind.

So finden sich in der Sublinie **ST398-A** in der Untergruppe **A1, A2, A3 und A4** oder in der Sublinie **ST398-B** und **-C** Haplotypen mit Isolaten unterschiedlicher Herkunft.

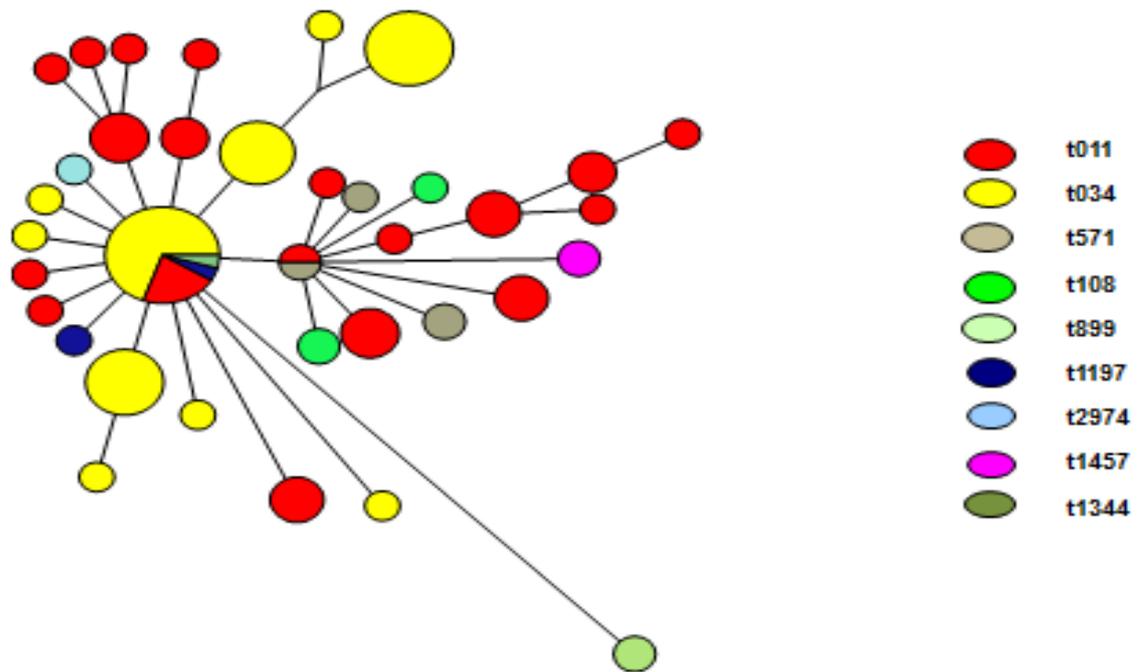
Die Untergruppe **ST398-A1** zeigt ein Cluster von Isolaten, in denen Pferde und Menschen einer Tierklinik in Österreich einen Haplotypen bilden (H34). Zusätzlich ist in dieser Untergruppe ebenfalls ein Cluster mit Isolaten von Rindern, Pferden, Hunden und Schweinen mit unterschiedlicher geographischer Herkunft (H32) vorhanden. Innerhalb der Untergruppe **ST398-A2** weist der Haplotyp H30 ein Isolat eines Landwirts sowie ein Isolat eines Schweines des dazugehörigen Betriebes auf. Auch in der Untergruppe **ST398-A3** und **-A4** zeigen sich sowohl aus Schweinen gewonnene Isolate als auch aus humanen Besiedlungsprozessen gewonnene Isolate in ein und demselben Haplotypen (H28 bzw. H18).

In der Sublinie **ST398-B** finden sich im Haplotypen H7 Isolate einer Katze, eines Menschen und ein Isolat aus der Untersuchung der Umgebung eines Patienten. Die Sublinie **ST398-C** (Haplotyp H2) umfasst Isolate von Schweinen verschiedener Altersklassen und Menschen aus Iowa sowie ein Isolat aus nasaler Besiedlung eines Hundes aus den Niederlanden. Sogar die Wurzel des Baumes, Haplotyp H1, wird gebildet aus Isolaten, welche aus einem menschlichen Besiedlungsgeschehen sowie einem tierischen Infektionsgeschehen (Rind) hervorgehen.

Das Vorhandensein von Isolaten mit unterschiedlichem Ursprung innerhalb eines Haplotypen sowie das häufige Auftreten von humanen Isolaten zusammen mit tierischen Isolaten deuten auf einen frequenten Austausch zwischen verschiedenen Wirtsspezies hin. Einzelne Haplotypen mit verschiedenen tierischen Isolaten (H32, H14) verdeutlichen die geringe Wirtsspezifität und darüber hinaus den Austausch zwischen verschiedenen Tierarten. Es gibt keine eindeutigen Hinweise für wirtsspezifische Cluster innerhalb des Baums.

### 5.3.4. *spa*-Typen

Abb. 9: MST in Korrelation mit der Verteilung der *spa*-Typen aller Isolate



Die Abbildung zeigt die Verteilung der einzelnen *spa*-Typen innerhalb des MST. Rot dargestellt sind Isolate des *spa*-Typen t011, gelb t034, grau t571, grün t108, dunkelblau t1197, hellblau t2974, pink t1457, olive t1344, hellgrün t899.

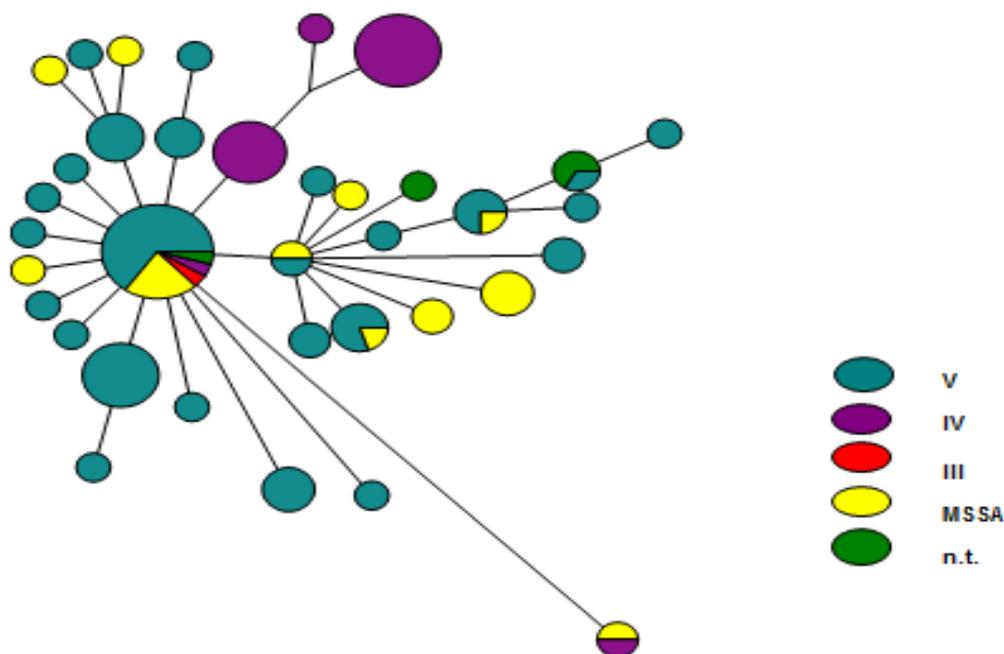
Betrachtet man den Haplotypen-MST (Abbildung 6) im Vergleich zu den vorhandenen *spa*-Typen (Abbildung 9), wird schnell klar, dass die vorherrschenden *spa*-Typen innerhalb des MST der Typ t011 (54 Isolate) und der Typ t034 (43 Isolate) sind. Die weiteren *spa*-Typen treten nur vereinzelt auf (siehe 5.1). Zwischen der Phylogenie und den *spa*-Typen besteht Konkordanz. Innerhalb der *spa*-Typen sind keine Homoplasien sichtbar.

### 5.3.4.1. MLST-Analyse einzelner Isolate

Die zwei Isolate mit *spa*-Typ t899 (Italien) wurden mittels MLST-Analyse auf ihre Zugehörigkeit zum ST398 geprüft. Es gibt Berichte über *S. aureus*-Isolate mit *spa*-Typ t899, die, je nachdem welches MLST-Muster sie aufweisen, entweder dem ST398 oder auch dem ST9 zugeordnet werden können. Diese Isolate konnten eindeutig dem ST398 zugeordnet werden und wiesen folgendes MLST-Muster (Allelprofil) auf: 3; 35; 19; 2; 20; 26; 39 (*arcc*, *aroe*, *glpf*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqil*). Andere Isolate wurden für diese Arbeit nicht mittels MLST analysiert.

### 5.3.5. SCCmec – Typen

Abb. 10: MST in Korrelation mit der Verteilung von SCCmec aller Isolate



Die Abbildung zeigt die Verteilung der SCCmec-Typen innerhalb des MST. Petrol sind Elemente des Typs V, lila Elemente des Typs IV, rot Elemente des Typs III, gelb MSSA und grün sind Isolate dargestellt, die mit den bis dahin verfügbaren Typisierungsmethoden nicht klassifizierbar waren.

Der auf den Haplotypen des ST398 basierende MST zeigt im Vergleich mit den verschiedenen SCCmec-Elementen einzelne Cluster, die nachfolgend näher beschrieben werden. Es wurden insgesamt 64 Isolate gefunden, die SCCmec-V beinhalten und 25

Isolate, welche SCC*mec*-IV besitzen. Es ist ein einzelnes, einheitliches Cluster mit Isolaten mit SCC*mec*-IV vorhanden. Dieses befindet sich im oberen Teil des Baumes. Lediglich zwei Isolate tragen SCC*mec*-IV und befinden sich an anderen Stellen (H15, H35) des MST. Alle Isolate gehören der Sublinie ST398-A an. Im linken Teil des Baumes findet man vorwiegend Isolate mit SCC*mec*-V wieder. Nur vereinzelt sind MSSA vertreten. Unter den verwendeten Isolaten befinden sich fünf Isolate, welche mit den momentan vorhandenen Methoden zur SCC*mec*-Typisierung nicht eindeutig typisierbar waren. Außerdem konnte ein Isolat identifiziert werden, dass SCC*mec*-III trägt. Dieses Isolat wurde von einem Menschen in Deutschland isoliert.

#### **5.3.4. Verteilung von MSSA und MRSA – Nachweis sekundärer MSSA**

In Abbildung 10 ist zusätzlich die Verteilung der MSSA- und MRSA-Isolate angegeben. Alle farbigen Haplotypen die nicht gelb sind, stellen MRSA-Isolate dar. Die gelben Isolate sind MSSA-Isolate. Die Position aller Isolate ist die gleiche wie in den bereits beschriebenen MST's. Der größte Anteil der verwendeten Isolate (94) sind Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA). Die 18 Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) sind im gesamten MST verteilt und man kann keine einheitliche Sublinie ableiten. An vielen Stellen im Baum kann man einzelne MSSA oder kleine Gruppen von MSSA-Isolaten finden. Die teilweise inhomogene Verteilung der MSSA lässt die Vermutung zu, dass es sich bei einigen dieser Isolate um sekundäre MSSA handeln könnte. Um in der vorgelegten Arbeit zu prüfen, ob die MSSA-Isolate eventuelle Reste von SCC*mec* aufweisen, wurden alle MSSA mittels Microarrays auf bestimmte Gene untersucht, die auf das Vorhandensein von SCC*mec* hindeuten. Spezielles Augenmerk wurde auf folgende Gene gelegt: *mecA*, *mecR*, *mecR\_truncated*, *mecl*, *ugpQ*, *ccrA*-1, *ccrA*-2, *ccrA*-3, *ccrAA*-MRS AZH47, *ccrA*-4, *ccrB*-1, , *ccrB*-3, , *ccrC*, *merA*, *merB*, *kdpA*-SCC, *kdpB*-SCC, *kdpC*-SCC, *kdpD*-SCC, *kdpE*-SCC. Weiterhin wurden am IMT Berlin etablierte PCR-Methoden nach *Golding und Chongtrokool* (siehe Abschnitt 4.8. in den Methoden) genutzt, um gezielt nach einzelnen Abschnitten (z. B. aus den einzelnen junkyard-Abschnitten) verschiedener SCC*mec*-Typen zu suchen.

In diese Untersuchungen gingen vorerst 19 Isolate mit ein. Es konnte mittels Microarray und folgenden PCR's nachgewiesen werden, dass ein Isolat (07-00415) fälschlicherweise als MSSA eingeordnet wurde. 07-00415 wies positive Reaktionen für *mecA*, *ugpQ*, *ccrAA*-MRS AZH47 und *ccrC* auf. Die zusätzlich durchgeführten PCR's für den Nachweis von *ccrC*, SCC*mec* V und MLEP waren positiv. Die Isolate 08-00360 und 08-01605 zeigten im Microarray positive Reaktionen für *ccrB*-4 bzw. *ccrA*-1 und *ccrB*-2. Nur für das Isolat 08-01605 konnte das Ergebnis anschließend per PCR bestätigt werden. Alle Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17: Ergebnisse zur Untersuchung auf das Vorhandensein sekundärer MSSA

Gen Isolat	08-00360	06-03005	07-01429	07-01826	07-02464	08-00537	08-00543	08-00700	08-00798
<b>mecA</b>	negativ								
<b>mecR</b>	negativ								
<b>mecR_truncated</b>	negativ								
<b>mecI</b>	negativ								
<b>ugpQ</b>	negativ								
<b>ccrA-1</b>	negativ								
<b>ccrA-2</b>	negativ								
<b>ccrA-3</b>	negativ								
<b>ccrAA-MRSAZH47</b>	negativ								
<b>ccrA-4</b>	negativ								
<b>ccrB-1</b>	negativ								
<b>ccrB-2</b>	negativ								
<b>ccrB-3</b>	negativ								
<b>ccrB-4</b>	unklar	negativ							
<b>ccrC</b>	negativ								
<b>merA</b>	negativ								
<b>merB</b>	negativ								
<b>kdpA-SCC</b>	negativ								
<b>kdpB-SCC</b>	negativ								
<b>kdpC-SCC</b>	negativ								
<b>kdpD-SCC</b>	negativ								
<b>kdpE-SCC</b>	negativ								
<b>Ergebnis der PCR</b>									
<b>ccrC</b>	negativ								
<b>SCCmec V</b>	negativ								
<b>ccr all</b>	negativ								
<b>MLEP</b>	negativ								

Gen \ Isolat	08-00888	08-01058	08-01223	08-01605	08-02710	09-01311	09-01312	09-02427	09-02478
mecA	negativ								
mecR	negativ								
mecR_truncated	negativ								
mecI	negativ								
ugpQ	negativ								
ccrA-1	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
ccrA-2	negativ								
ccrA-3	negativ								
ccrAA-MRSAZH47	negativ								
ccrA-4	negativ								
ccrB-1	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
ccrB-2	negativ								
ccrB-3	negativ								
ccrB-4	negativ								
ccrC	negativ								
merA	negativ								
merB	negativ								
kdpA-SCC	negativ								
kdpB-SCC	negativ								
kdpC-SCC	negativ								
kdpD-SCC	negativ								
kdpE-SCC	negativ								
<b>Ergebnis der PCR</b>									
ccrC	negativ								
SCCmec V	negativ								
ccr all	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
MLEP	negativ								

Die Tabelle gibt alle Ergebnisse der untersuchten MSSA Isolate wieder. Im oberen Teil der Tabelle sind alle untersuchten SCC*mec*-Gene des Microarrays (linke Spalte nach unten) abgebildet und die jeweils untersuchten MSSA-Isolate (obere Zeile nach rechts laufend). Die unteren 4 Zeilen zeigen eine Zusammenfassung der dazu durchgeführten PCRs zur Prüfung vorliegender Ergebnisse. Alle Informationen dazu sind im Absatz Material und Methoden unter 4.8. ff. zu finden.

#### 5.4. Nachweis von Synonymen und Nicht-synonymen Substitutionen

Bei der evolutionären Entstehung von Einzelnukleotidpolymorphismen innerhalb des bakteriellen Genoms kann es zu Verschiebungen oder Austausch einzelner Basen innerhalb der Aminosäuresequenz kommen. Wenn ein Austausch eines Nukleotids im Codon nicht zu einer Änderung der kodierten Aminosäure führt, nennt man dies Synonyme Substitution (*Ks*). Im Gegensatz dazu führt bei Nicht-synonymen Substitutionen (*Ka*) der Austausch eines Nukleotids im Codon stets zur Veränderung der kodierten Aminosäure. Durch die Analyse mit Hilfe der Software *DnaSP* ist es möglich, Synonyme von Nicht-synonymen

Basensubstitutionen zu unterscheiden [235]. So konnten innerhalb der für Proteine kodierenden Regionen von den insgesamt 55 identifizierten Einzelnukleotidpolymorphismen 26 als Synonyme sowie 29 als Nicht-synonyme Basensubstitutionen ermittelt werden (Tabelle 18). Die gefundenen fünf Unterschiede zum publizierten Genom SO385 wurden durch Datenbankabgleich ermittelt und gingen nicht in die Berechnungen mit ein, da keine eigenen Sequenzdaten für die *DnaSP* Analyse vorlagen.

Tab. 18: DNA-Polymorphismen der untersuchten Isolate, die in 100 Loci mittels *dHPLC* gefunden wurden

SNP-ID	Auswirkung der Mutation	Ursprung	Abgeleitet	Transition (si)/ Transversion (ver)	Position Genom N315	im von	ORF
au200-1	Nicht-syn.	C	T	si	23549		SA0016
au200-2	Synonym	A	G	si	23320		SA0016
au200-3	Synonym	C	T	si	23473		SA0016
au201-1	Synonym	G	A	si	110580		SA0098
au201-2	Synonym	C	T	si	110658		SA0098
au201-3	Synonym	T	A	ver	110688		SA0098
au201-4	Nicht-syn	C	T	si	110786		SA0098
au202-1	Synonym	A	G	si	130279		SA0113
au202-2	Synonym	C	T	si	130408		SA0113
au202-3	Synonym	T	C	si	130510		SA0113
au202-4	Synonym	A	T	ver	130600		SA0113
au202-5	Synonym	A	G	si	130615		SA0113
au203-1	SO385	C	T	si	146630		SA0123
au208-1	Nicht-syn	G	A	si	310134		SA0256
au209-1	Nicht-syn	C	T	si	355147		SA0299
Au212-1	Synonym	T	A	ver	405843		SA0346
au215-1	Synonym	C	T	si	495950		SA0431
au215-2	Synonym	A	T	ver	496248		SA0431
au223-7	Nicht-syn	A	G	si	836811		SA0730
au227-1	Nicht-syn	C	T	si	1181710		SA1044
au230-1	Nicht-syn	T	G	ver	1401435		SA1126
au231-1	Nicht-syn	C	A	ver	1514080		SA1308
au232-1	Nicht-syn	T	G	ver	1617751		SA1411
au234-1	Synonym	A	G	si	1767186		SA1545
au236-1	Nicht-syn	C	A	ver	2054124		SA1814
au237-1	Synonym	T	C	si	2173581		SA1924
au239-3	Synonym	T	A	ver	2384088		SA2120
au239-4	Nicht-syn	G	A	si	2384266		SA2120
au243-1	Nicht-syn	G	C	ver	2782125		SA2470
au244-1	Synonym	G	A	ver	207306		SA0177
au244-2	SO385	A	-	Deletion	210973		SA0177
au251-1	Nicht-syn	T	A	ver	764249		SA0672
au252-1	Nicht-syn	T	A	ver	926135		SA0821
au252-2	Synonym	C	T	si	926331		SA0821
au252-3	Nicht-syn	G	A	si	926400		SA0821
au256-1	Nicht-syn	G	A	si	1307973		SA0924
au260-1	Synonym	A	T	ver	1781463		SA1554
au261-1	Synonym	T	C	si	1824383		SA1585

SNP-ID	Auswirkung der Mutation	Ursprung	Abgeleitet	Transition (si)/ Transversion (ver)	Position Genom N315	im von ORF
au262-1	Nicht-syn	C	T	si	1905981	SA1669
au264-1	Synonym	G	A	si	2105693	SA1864
au265-1	Synonym	C	T	si	2226039	SA1965
au269-1	Nicht-syn	G	A	si	2517329	SA2240
au273-1	Synonym	G	A	si	2681148	SA2293
au278-1	SO385	G	T	ver	1974013	SA1619
au278-2	SO385	T	C	si	1974016	SA1619
au278-3	SO385	A	G	si	1974025	SA1619
au279-1	Nicht-syn	A	G	si	847179	SA0740
au279-2	Nicht-syn	T	C	si	847242	SA0740
au286-1	Nicht-syn	G	A	si	267739	SA0223
au289-1	Nicht-syn	G	T	ver	750626	SA0656
au291-1	Nicht-syn	G	A	si	1001916	SA0881
au294-1	Nicht-syn	C	T	si	1274252	SA1121
au294-2	Nicht-syn	A	C	ver	1274206	SA1121
au298-1	Synonym	C	T	si	1559541	SA1349
au300-1	Synonym	C	T	si	1886902	SA1652
au300-2	Nicht-syn	G	A	si	1886966	SA1652
au300-3	Nicht-syn	G	A	si	1887167	SA1652
au304-1	Nicht-syn	G	A	si	2097970	SA1858
au309-1	Nicht-syn	T	C	si	2459898	SA2188
au309-2	Synonym	A	T	ver	2460229	SA2188

Die Spalten geben den Namen des SNPs, die Auswirkung der Mutation, das ursprüngliche und abgeleitete Nukleotid sowie die Veränderung der Nukleobasen, die Genomposition in N315 und den ORF des blast dazu an.

Es ist möglich, mittels *DnaSP*-Analyse weitere Parameter zu untersuchen. Für die konkatenierte Sequenz aller untersuchten Loci wurde die Nukleotiddiversität  $\pi$  ermittelt, und das Verhältnis aus Synonymen zu Nicht-synonymen Substitutionen ( $K_s/K_a$ ) errechnet. Die Nukleotiddiversität  $\pi$  gibt die durchschnittliche Anzahl an Nukleotidunterschieden pro Position zwischen zwei Sequenzen an [236], [235]. Sie definiert somit die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig auserwählte Nukleotide unterschiedlich sind. Um die Diversität der untersuchten Gene darzustellen, wurde für jede Nukleotidposition im Gen der zugehörige  $\pi$ -Wert berechnet [237]. Die Nukleotiddiversität  $\pi$  beträgt für die zugrundegelegte Population  $0,00008 \pm 0,00001$ . Untersucht wurden 41.199 Basenpaare aus proteinkodierenden Regionen. Das Verhältnis aus  $K_s$  zu  $K_a$  gibt die Form der Sequenzevolution wieder und beschreibt das Verhältnis der Austauschprozesse von Nicht-synonymen zu Synonymen Seiten.  $K_s/K_a$  beträgt 0,283. Werte kleiner als 1 zeigen, dass innerhalb der Population hoher positiver Selektionsdruck erwartet wird [238].

## 5.5. Demographische Analyse der Populationsgröße

Mit aus molekularen Untersuchungen gewonnenen Datensätzen und dem Konzept molekularer Uhren versucht man seit vielen Jahren, lückenhafte Verzweigungen in Stammbäumen zu datieren. Um den zeitlichen Verlauf der Populationsgröße für die in dieser Arbeit verwendeten Isolate zu berechnen, nimmt man die Nukleotiddiversität ( $\pi$ ) zu Hilfe. Diese steigt im Verlaufe der Zeit ( $t$ ) durch eine Anhäufung von Mutationen stetig an. Geht man, wie von *Zuckerkandl und Pauling* beschrieben, von einer konstanten Substitutionsrate als molekulare Uhr aus, dann ist  $\pi$  eine lineare Funktion der vergangenen Zeit ( $\pi = -t \cdot \mu$ ) [232]. Durch Zuhilfenahme des Bayesianischen Verfahrens der Software *BEAST* konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden.

Tab. 19: Ergebnisse der *BEAST*-Analyse

Model		Zetrate	95% Konfidenz- intervall	95% Konfidenz- intervall	tmrca	95% Konfidenz- intervall	95% Konfidenz- intervall
Bayesian skyline	strict	$8,14 \times 10^{-6}$	$4,23 \times 10^{-6}$	$1,26 \times 10^{-5}$	$1,84 \times 10^1$ (18)	$6,72 \times 10$	$3,46 \times 10^1$
Bayesian skyline	relaxed	$1,04 \times 10^{-6}$	$5,69 \times 10^{-6}$	$1,57 \times 10^{-5}$	$1,39 \times 10^1$ (14)	$6,11 \times 10$	$2,79 \times 10^1$
Constant population size	strict	$8,07 \times 10^{-6}$	$4,82 \times 10^{-6}$	$1,16 \times 10^{-5}$	$2,30 \times 10^1$ (23)	$1,08 \times 10^1$	$3,70 \times 10^1$

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der *Beast*-Analyse. (*tmrca* = *time since the most recent common ancestor*, engl.; Zeit, die vergangen ist seit dem letzten gemeinsamen Vorfahren)

Durch serienmäßige, zeitlich strukturierte Proben der DNA-Sequenzen konnte die Anhäufung genetischer Unterschiede über einen kurzen Zeitraum von einigen Jahren verfolgt werden. Die aus diesen Isolatedaten errechneten Werte deuten daraufhin, dass der nunmehr weit verbreitete *S. aureus* des ST398 zwischen 1988 und 1997 (vor etwa 14 bis 23 Jahren, Konfidenzintervall 95%) entstanden ist. Somit entstand dieser Klon wahrscheinlich einige Jahre, bevor er erstmals vermehrt nachgewiesen worden ist.

Einstellungen wie die 'Tree priors' und 'Clock models' wurden variiert, um zu sehen, welchen Effekt diese auf das Ergebnis haben. Die alternativ gewählten Einstellungsoptionen für das Bayesianische Verfahren zeigten sehr ähnliche Zeitspannen. Wie auch bei ST225 ist dieser Effekt somit gering [239].

## 5.6. Transmissionsstudie

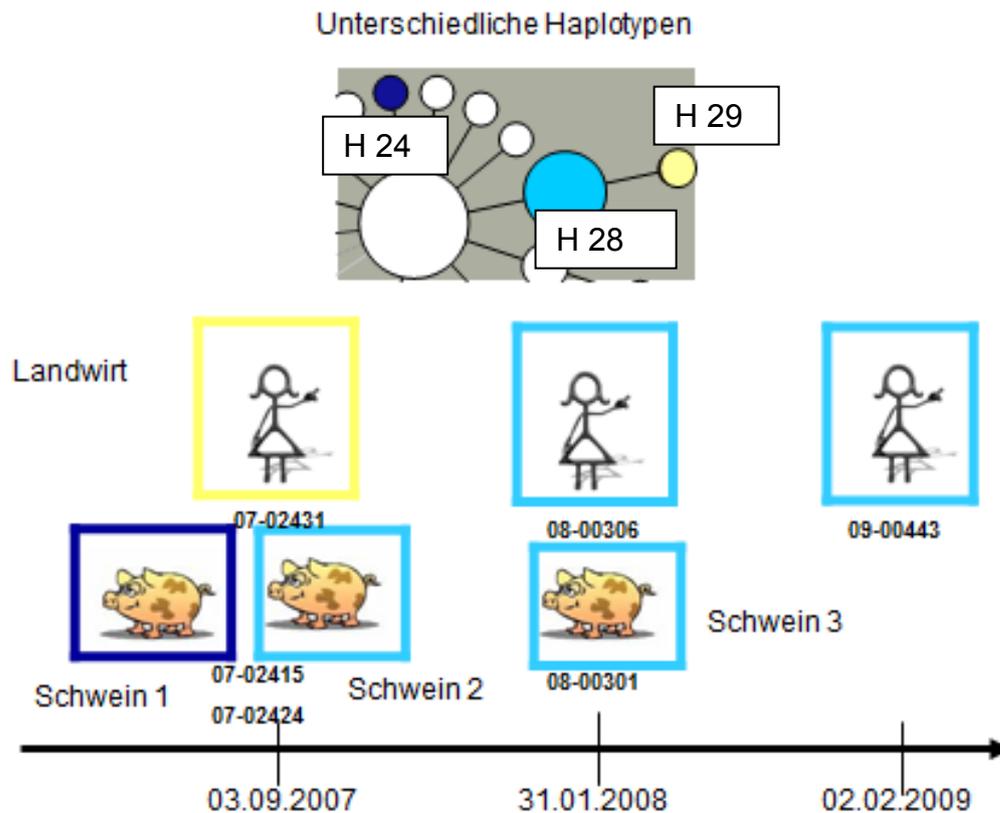
Die Tabelle zeigt den jeweiligen Betrieb, die Isolatenummern sowie Isolationsdaten, den Isolationsort, die Wirtsspezies und den Infektionsstatus. Die letzten beiden Spalten geben den Haplo- und den *spa*-Typen an. Alle grau unterlegten Daten gingen in die Studie ein.

Zusätzliche Details zu allen Isolaten gibt Tabelle 11 wieder.

Tab. 20: Isolatedaten; wichtigste Daten zu den Isolaten welche in die Studie eingingen

Betrieb	Isolate-bezeichnung	Isolations-datum	Bundesland	Probe von:	Infektion/Besiedlung	Genotyp	spa-Typ	
1	07-01274	26.04.2007	Niedersachsen	Schwein	unbekannt	H5	t034	
	07-02632	10.09.2007	Niedersachsen	Landwirt	unbekannt	H6	t034	
	07-02642	10.09.2007	Niedersachsen	Familienmitglied	unbekannt	H18	t034	
2	07-02415	03.09.2007	Sachsen-Anhalt	Schwein1	Besiedlung	H24	t2974	
	07-02431	03.09.2007	Sachsen-Anhalt	Landwirt	Besiedlung	H29	t011	
	07-02424	03.09.2007	Sachsen-Anhalt	Schwein2	Besiedlung	H28	t011	
	07-02432	03.09.2007	Sachsen-Anhalt	Personal1	unbekannt	H28	t011	
	07-02433	03.09.2007	Sachsen-Anhalt	Personal2	unbekannt	H28	t011	
	08-00301	30.01.2008	Sachsen-Anhalt	Schwein	Besiedlung	H28	t011	
	08-00306	30.01.2008	Sachsen-Anhalt	Landwirt	unbekannt	H28	t011	
	08-00307	30.01.2008	Sachsen-Anhalt	Personal1	unbekannt	H28	t011	
	08-00308	30.01.2008	Sachsen-Anhalt	Personal2	unbekannt	H28	t011	
	09-00443	02.02.2009	Sachsen-Anhalt	Landwirt	unbekannt	H28	t011	
	09-00444	02.02.2009	Sachsen-Anhalt	Personal1	unbekannt	H28	t011	
	09-00445	02.02.2009	Sachsen-Anhalt	Personal2	unbekannt	H28	t011	
	3	08-00907	17.04.2008	Niedersachsen	Landwirt	Besiedlung	H35	t011
		08-00912	17.04.2008	Niedersachsen	Schwein	Besiedlung	H30	t034
		08-02208	06.10.2008	Niedersachsen	Landwirt	Besiedlung	H31	t034
09-00709		19.02.2009	Niedersachsen	Landwirt	Besiedlung	H30	t034	
09-00711		19.02.2009	Niedersachsen	Schwein	Besiedlung	H35	t034	
4	09-02165	08.06.2009	Niedersachsen	Schwein	unbekannt	H18	t034	
	09-02423	16.07.2009	Niedersachsen	Landwirt	keine	H35	t011	
	09-02611	06.08.2009	Niedersachsen	Landwirt	keine	H18	t034	
	09-02615	06.08.2009	Niedersachsen	Schwein	keine	H18	t034	
5	08-01712	21.07.2008	Nordrhein-Westfalen	Schwein	Besiedlung	H35	t011	
	08-01849	30.07.2008	Nordrhein-Westfalen	Umgebungsunter-suchung; Probe aus Schweinebucht	-	H17	t011	
	09-00393	21.01.2009	Nordrhein-Westfalen	Landwirt	keine	H3	t034	

Abb. 11: Zeitdiagramm Betrieb 2



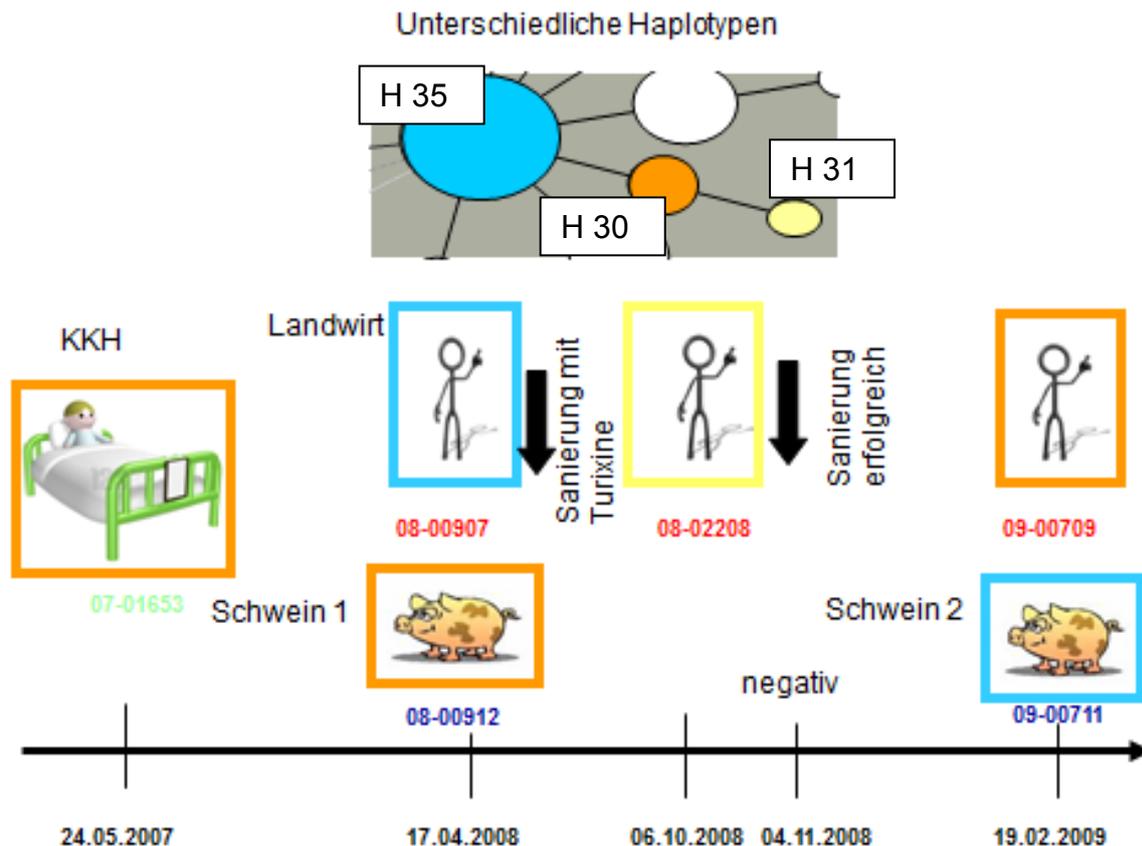
Die Abbildung zeigt einen zeitlichen Verlauf aller Probenuntersuchungen im Betrieb 2. Unten ist eine Zeitskala dargestellt. Darüber findet man die zugehörigen Isolate der Schweine und des Landwirts. Im obersten Teil ist ein Ausschnitt des MST dargestellt. Dieser zeigt einige ausgewählte Haplotypen. Die farbige unterlegten Bilder sollen analog zum oberen Ausschnitt des MST die Verteilung der Haplotypen verdeutlichen. Hellblau dargestellt sind die Isolate des Haplotypen H28. Dunkelblau ist der Haplotyp H24 und gelb der Haplotyp 29.

Alle gewonnenen Isolate von Betrieb 2 wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten isoliert. Sofort fiel auf, dass bis auf ein Isolat alle den *spa*-Typen *t011* besaßen. Lediglich ein Isolat (07-02415, Schwein) hatte den *spa*-Typ *t2974*. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf dieser Untersuchungen genauer kann man erkennen, dass die verschiedenen Isolate unterschiedlichen Haplotypen im MST zugeordnet sind. Der Landwirt war bei der ersten Probenahme am 30.09.2007 (Isolat 07-02431) mit einem *S. aureus*-Stamm des Haplotypen H29 besiedelt. Bei den folgenden Untersuchungen am 30.01.2008 und am 02.02.2009 wurde dann der Haplotyp 28 (Isolat 08-00306 und 09-00443) nachgewiesen. Bei der *spa*-Typisierung wiesen alle drei Isolate den *spa*-Typ *t011* auf.

Beide Mitarbeiter (Personal1 und 2) des Betriebes waren zu allen Untersuchungszeitpunkten konstant mit einem MRSA-*t011*/H28 besiedelt. In den in dieser Arbeit untersuchten Genloci konnten keine Unterschiede zwischen diesen Isolaten gesehen werden. Etwas anders

verhielt es sich bei den untersuchten Schweinen. Schon beim ersten Untersuchungstermin konnten MRSA-Isolate mit unterschiedlichen *spa*-Typen (Schwein 1, *t2974*; Schwein 2, *t011*) und Haplotypen (H24; H28) nachgewiesen werden. Später beprobte Schweine wiesen dann nur den *spa*-Typ *t011* auf und gehörten dem Haplotyp H28 an.

Abb. 12: Zeitdiagramm Betrieb 3



Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf aller Probenuntersuchungen im Betrieb 3. Unten ist eine Zeitskala dargestellt. Darüber findet man die zugehörigen Isolate der Schweine und des Landwirts. Im obersten Teil ist ein Ausschnitt des MST dargestellt. Dieser zeigt einige ausgewählte Haplotypen. Die farblich unterlegten Bilder sollen analog zum MST-Ausschnitt die Verteilung der Haplotypen verdeutlichen. Hellblau dargestellt sind die Isolate des Haplotypen H35, orange ist der Haplotyp H30 und gelb der Haplotyp 31.

Bei dem beprobten Landwirt von Betrieb 3 konnte in der Probe vom 17.04.2008 (Isolat 08-00907) *S. aureus* nachgewiesen werden. Es handelte sich um ein Isolat mit dem *spa*-Typ *t011* und dem Haplotyp 35. Im Betrieb wurden zeitgleich mehrere Schweine beprobt und repräsentativ für alle (alle Isolate gleicher *spa*-Typ und *SCCmec*) ein Isolat (08-00912) SNP-typisiert. Das zum selben Zeitpunkt beprobte Schwein wies den Haplotyp 30 und den *spa*-

Typ *t034* auf (Isolat 08-00912). Nach dem positiven Nachweis von *S. aureus* beim Landwirt fand eine Sanierung der Nasenhöhlen mittels Thurexine-Nasensalbe statt.

Wie das Ergebnis der Probe vom 06.10.2008 zeigt, konnte bei dem Landwirt erneut MRSA nachgewiesen werden (Isolat 08-02208). Diesmal wurden in der Nasentupferprobe Isolate mit dem *spa*-Typ *t034* und dem Haplotyp 31 festgestellt. Erneut fand eine Sanierung des Betroffenen statt. Die Behandlung wurde am 22.08.2009 durch Tupferprobenahme kontrolliert und war erfolgreich (Negativergebnis). Bei einer weiteren Kontrolle am 19.02.2009 wurde in den Tupferproben des Landwirtes erneut MRSA mit *spa*-Typ *t034* und Haplotyp 30 gefunden (Isolat 09-00709). Eines der zu diesem Zeitpunkt beprobten Schweine wies MRSA des *spa*-Typ *t034* und des Haplotyp 35 auf (Isolat 09-00711).

Betrachtet man analog zu Abbildung 11 die verschiedenen Positionen im MST dieser Isolate, so kann man erkennen, dass der Landwirt mit drei unterschiedlichen Haplotypen (erst H35, dann H31 und dann H30) besiedelt war und diese genetische Unterschiede von jeweils mindestens einem SNP in den hier untersuchten Loci aufwiesen. Da jede Veränderung im Genom zu einem anderen Genotypen führt, ist es möglich, die Veränderungen der unterschiedlichen Genotypen anhand des Baumes nachzuvollziehen. Auffallend ist, dass in dieser Studie ein Isolat aus einem Krankenhaus in Deutschland (07-01653) vorhanden war, welches bereits 2007 isoliert wurde und den Haplotypen H 30 aufwies. Es war nicht unterscheidbar zu allen anderen in der Transmissionsstudie untersuchten Isolaten des Haplotypen H30. Dieser Genotyp existierte damit in Deutschland bereits vorher.

## 5.7. Pulsfeldgelelektrophorese

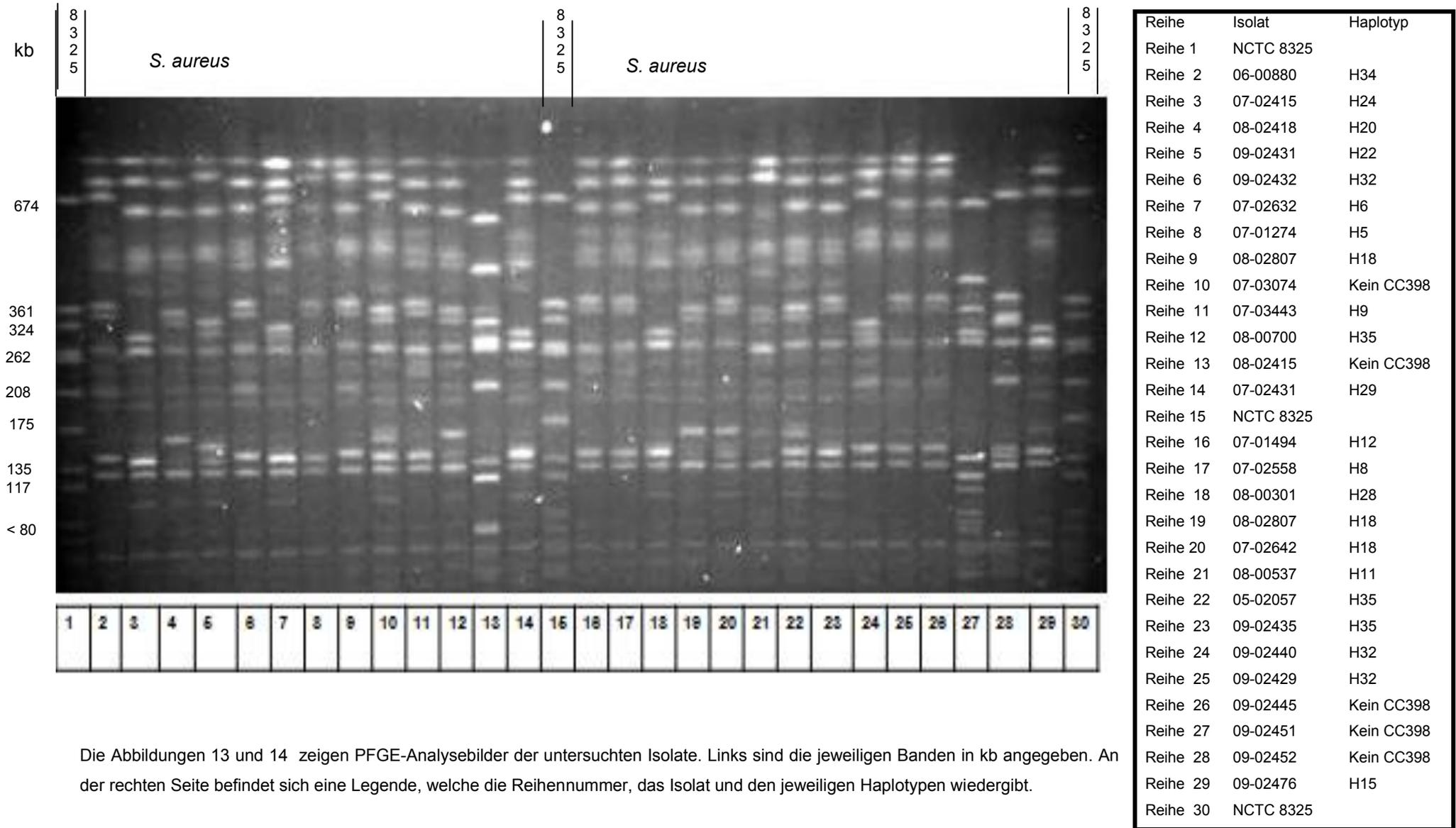
Um einen Vergleich zwischen der Aussagekraft der Pulsfeldgelelektrophorese und der Untersuchung von Einzelnukleotidpolymorphismen anstellen zu können, wurden von jedem Haplotypen ein oder mehrere Isolate mittels PFGE untersucht. Die Abbildung 13 zeigt das entstandene Pulsfeldgelbild der ersten 27 Isolate. Einige Isolate der Analyse gehören nicht dem klonalen Komplex CC398 an. Sie wurden im Laufe dieser Arbeit anderen klonalen Komplexen zugeordnet. Dargestellt sind diese Isolate durch die Banden 10, 13 und 26-28. Augenmerk wurde vor allem darauf gelegt, ob es mittels PFGE möglich ist, Cluster zu identifizieren, die zuvor auch im MST Cluster gebildet haben oder Isolate zu finden die zumindest eng miteinander verwandt sind. Abbildung 14 zeigt die weiteren 25 Isolate, die in diese Untersuchung mit eingegangen sind. Abbildung 15 zeigt das dazugehörige Dendrogramm.

Zur Auswertung der Reihen wurden die Kriterien nach *Tenover et al.* zur Grundlage genommen [225]. Als Referenzstamm diente der Stamm NCTC 8325. Es wurden Fragmente bis zu einer Größe von etwa 700 kb untersucht [225]. Insgesamt konnten 47 Isolate mittels PFGE analysiert werden. Alle Isolate haben einen unterschiedlichen Hintergrund und sind als Gesamtheit nicht epidemiologisch zu bewerten. *Tenover* unterscheidet in seiner Publikation 4 verschiedene Möglichkeiten zur Einteilung der Bandenmuster. Den ersten Typen bildeten ununterscheidbare Muster. Zum zweiten Typen gehören eng verwandte Bandenmuster (2-3 Bandenunterschiede). Der dritte Typ sind möglicherweise verwandte Bandenmuster (4 bis 6 Bandenunterschiede) und der letzte und vierte Typ ist charakterisiert durch unverwandte Muster (7 und mehr Bandenunterschiede) [225].

In der Abbildung 13 kann man im ersten Abschnitt (Reihe 2 bis 14) ein heterogenes Bild der Bandenmuster erkennen. Sie scheinen nicht eng verwandt miteinander zu sein. Im Gegenteil dazu kann man im zweiten Abschnitt einzelne ähnliche Muster finden (Bsp.: Reihe 16, 17). Die Isolate beider Reihen besitzen den *spa*-Typ *t034* und *SCCmec V*. Die Reihen der nachträglich aus der Studie genommenen Isolate zeigen sehr unterschiedliche Bandenmuster im Vergleich mit Isolaten des CC398.

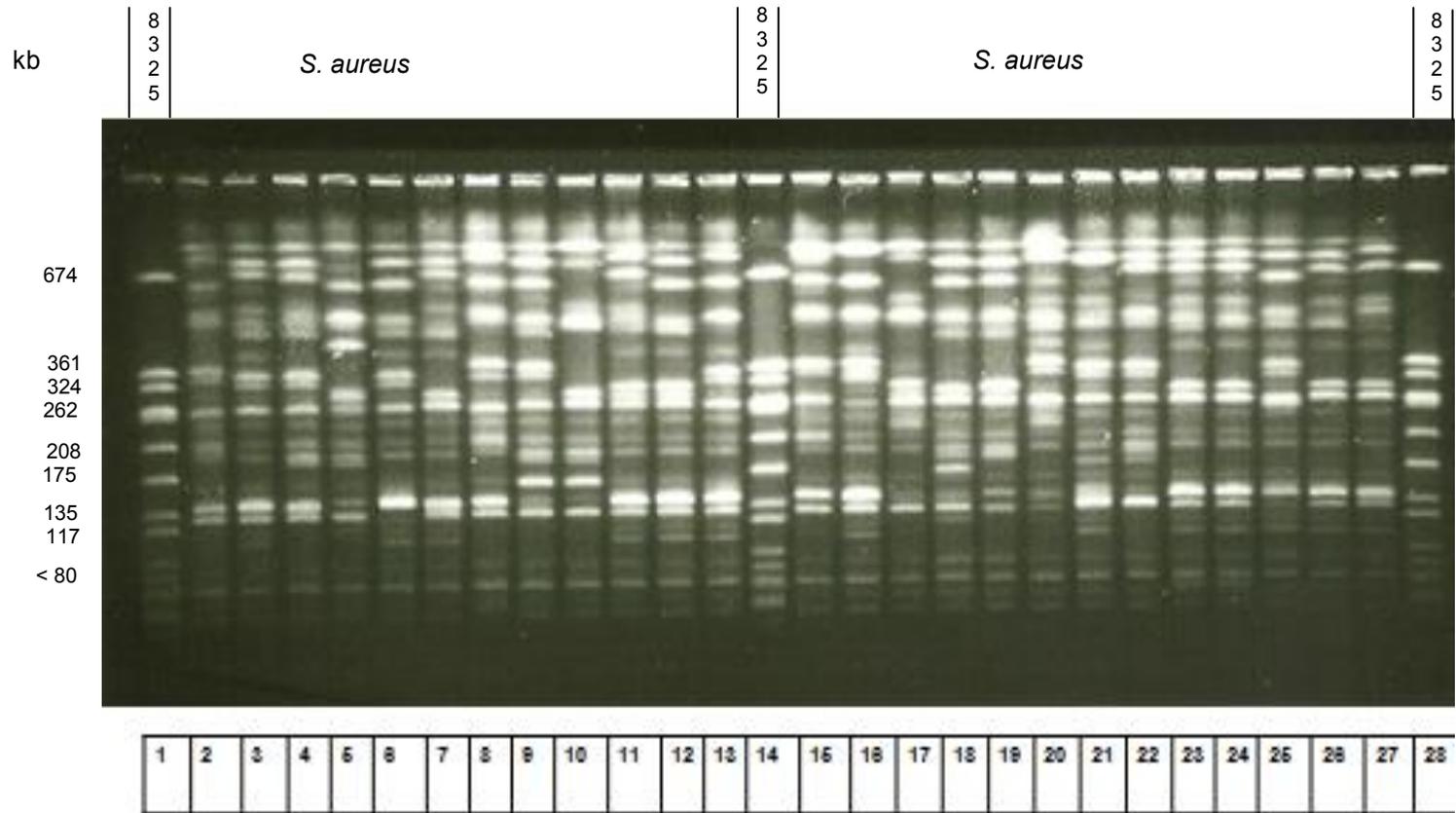
Abbildung 14 zeigt homogenere Bandenmuster. Es fällt auf, dass einige Isolate ähnliche oder nicht-unterscheidbare Bandenmuster besitzen (09-02437 und 09-02439 = nicht-unterscheidbar; 07-02239 und 09-02444 = ähnlich). Bei beiden Paaren sind sowohl *spa*-Typ (*t1457* bzw. *t108*) als auch *SCCmec (V)* identisch. Eine Korrelation zwischen PFGE-Daten und geographischem Hintergrund liegt nicht vor. Die minimale Similarität zwischen allen CC398-Isolaten beträgt etwa 55%. Die meisten Isolate teilen allerdings eine Similarität von etwa 70%.

Abb. 13: Bilder von Pulsfeldgelen ausgesuchter Isolate



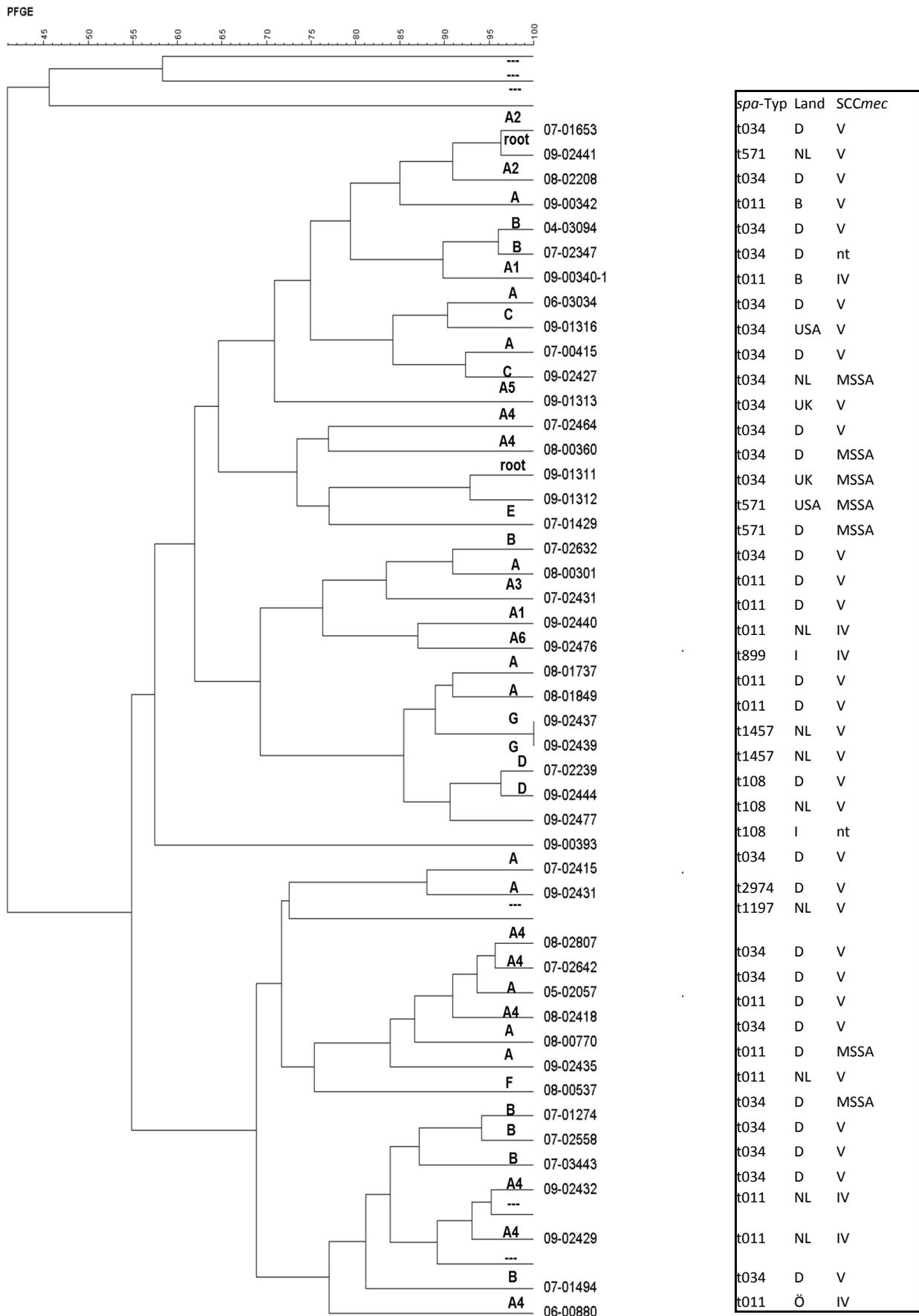
Die Abbildungen 13 und 14 zeigen PFGE-Analysebilder der untersuchten Isolate. Links sind die jeweiligen Banden in kb angegeben. An der rechten Seite befindet sich eine Legende, welche die Reihennummer, das Isolat und den jeweiligen Haplotypen wiedergibt.

Abb. 14: Bilder von Pulsfeldgelen ausgesuchter Isolate



Reihe	Isolat	Haplotyp
Reihe 1	NCTC 8325	
Reihe 2	04-03094	H7
Reihe 3	06-03034	H27
Reihe 4	07-00415	H25
Reihe 5	07-01429	H12
Reihe 6	07-01653	H30
Reihe 7	07-02239	H14
Reihe 8	07-02347	H7
Reihe 9	07-02464	H19
Reihe 10	08-00360	H21
Reihe 11	08-01737	H26
Reihe 12	08-01849	H17
Reihe 13	08-02208	H31
Reihe 14	NCTC 8325	
Reihe 15	09-00340-1	H33
Reihe 16	09-00342	H23
Reihe 17	09-00393	H3
Reihe 18	09-01311	H1
Reihe 19	09-01312	H13
Reihe 20	09-01313	H16
Reihe 21	09-01316	H2
Reihe 22	09-02427	H2
Reihe 23	09-02437	H10
Reihe 24	09-02439	H10
Reihe 25	09-02441	H1
Reihe 26	09-02444	H14
Reihe 27	09-02477	H4
Reihe 28	NCTC 8325	

Abb. 15: Dendrogramm für alle Isolate, die mittels PFGE untersucht wurden



Die Abbildung zeigt das Dendrogramm der angegebenen Isolate. Die Buchstaben geben die Sublinien des MST wieder. Alle Isolate, die mit --- gekennzeichnet sind, wurden aus der Studie genommen, da sie nicht mittels *dHPLC* untersucht wurden bzw. nicht zum CC398 gehörten. Die Isolate 09-01312, 09-02477 und 09-00393 clustern einzeln im MST und gehören keiner Sublinie an.

Betrachtet man nochmals den MST zur Phylogeographie, kann man einige Übereinstimmungen zwischen Restriktionsmustern und Clustern/ Sublinien im MST sehen. Einige eng verwandte Isolate clustern zusammen im MST und besitzen ähnliche bzw. gleiche Restriktionsmuster der PFGE. Die Isolate 09-02437 und 09-02439 (100% Similarität) bilden H 10 in Sublinie G. Die Isolate 07-02239 und 09-02444 (97% Similarität) bilden H14 in Sublinie D. Der obere Teil des Dendrogramms zeigt nicht übereinstimmende Muster. Immer wieder wechseln sich verschiedene Haplotypen und Sublinien ab. Es scheint keine wirklich eindeutigen Übereinstimmungen zu geben. Nur teilweise findet man dicht benachbarte Isolate aus dem MST, auch dicht benachbart in der PFGE-Analyse wieder. Isolate der Sublinie A (Bsp.: 09-00342 o. 07-00415) scheinen laut PFGE-Daten eng verwandt mit Isolaten der Sublinie B (Bsp.: 04-03094) oder C (Bsp.: 09-02427 o. 09-01316). Im unteren Teil des Dendrogrammes sind vermehrt eng verwandte Isolate, die ähnliche Restriktionsmuster besitzen. Nur 2 SNPs unterscheiden die Sublinien A und A4 voneinander. Zwischen diesen übereinstimmenden Isolaten ist jedoch ein Isolat der Sublinie F (08-00537) und Isolate der Sublinie B (07-01274, 07-02558, 07-03443) eingegliedert. Diese sollten eigentlich keine verwandten Restriktionsmuster besitzen, wenn man lediglich den MST betrachten würde.

Im Gegensatz dazu findet man eine hohe Übereinstimmung innerhalb der Sublinie B. Die drei Isolate gehören eng benachbarten Haplotypen an, was sich auch in ihren Restriktionsmustern widerspiegelt.

## 6. Diskussion

### 6.1. Diskussion - Mikroevolution des klonalen Komplexes CC398

#### 6.1.1. Phylogeographie des klonalen Komplexes CC398

Zur Analyse der Populationsstruktur dieses Klons von *S. aureus*-CC398 wurde die Methode der Untersuchung von Einzelnukleotidpolymorphismen genutzt. Es gelang bereits, die Phylogenie einiger Spezies (*Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enterica* Typhi) anhand dieser Methode zu erforschen [240]; [241]; [242]. Außerdem wurden in den letzten Jahren Untersuchungen zu Populationsanalysen verschiedener *S. aureus*-Sequenztypen (ST5, ST225) vorgenommen, die es ermöglichten Evolutionshintergründe zu erschließen [110]; [239]; [166].

Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf die genetische Diversität als Ausdruck der Verteilung in Relation zu Geographie und Zeit gelegt. Des Weiteren sollte die Diversität im Verhältnis zur gegebenen Wirtsspezies erforscht und eine mögliche Adaptation an bestimmte Wirte geprüft werden. Ähnliche Analysen wurden bereits für den ST5 und den ST225 durch *Nübel et.al* sowie für den CC121 von *Kurt et.al* durchgeführt [110], [239], [243].

Betrachtet man die Verteilung der Isolate in den MSTs wird schnell klar, dass dieser Klon bereits in vielen Ländern und auch auf verschiedenen Kontinenten nachgewiesen werden kann. Seit den ersten publizierten Nachweisen im Jahr 2005 scheint sich dieses Bakterium weltweit explosionsartig in Schweinebeständen verbreitet zu haben [13], [55], [16], [28], [141], [149]. Ein Verbreitungsgrund von *S. aureus* CC398 in Schweinepopulationen ist sicherlich im florierenden weltweiten Handel mit lebenden Schweinen zu sehen. Durch weitergehende Untersuchungen konnten verschiedene weitere Spezies als Träger von *S. aureus*-CC398 identifiziert werden (niedrige Wirtsspezifität). Der Zusammenhang zwischen den jeweiligen Haplotypen und deren geographischen Ursprüngen der Isolate des CC398, welcher in dieser Arbeit untersucht wurde, ist eher schwach. Es sieht so aus, als wären bestimmte Sublinien in verschiedene europäische Länder verbreitet worden. Es sind mehrere Cluster deutscher Isolate vorhanden. Diese stellten allerdings auch die größte Gruppe an bereitgestellten Isolaten dar. Alle Isolate aus Österreich clustern dicht benachbart in der Untergruppe **ST398-A1**. Die Isolate aus Belgien sind an verschiedenen Stellen im MST sichtbar (Haplotyp H23, H33 und H35). Man kann davon ausgehen, dass hier in Belgien mindestens 2 verschiedene Haplotypen eingeführt wurden. Isolate aus dem Vereinigten Königreich bilden ein Cluster **ST398-A5** (H 16). Ein epidemiologischer Zusammenhang ist durch die Herkunft aller Isolate aus einem Krankenhaus gegeben. Nur ein Isolat bildet zusammen mit einem Isolat aus den Niederlanden die „root“ des MST.

Betrachtet man die zeitlichen Zusammenhänge und den MST, könnte man annehmen, dass das Isolat 09-1311 (isoliert 2005, MSSA) der ursprüngliche Klon dieser kleinen Auswahl an Isolaten aus einem Krankenhaus in Glasgow ist, und sich die weiteren Isolate (isoliert 2006, 2007) daraus entwickelt haben könnten. Um diese These zu stützen, müssten ähnlich wie bei *Nübel et. al* oder bei *Dordel* weitergehende Untersuchungen auf Krankenhausbasis mit einer größeren Auswahl an Isolaten und möglichst genomweite Untersuchungen von SNPs durchgeführt werden [239], [244]. Die US-amerikanischen Isolate clustern bis auf eine Ausnahme zusammen (**ST398-C**). Alle diese Isolate stammen aus Iowa und wurden von einer Schweinemastanlage genommen. Das zweite Isolat stammt aus New York und bildet ein monophyletisches Cluster. Nur zwei der drei Isolate aus Italien clustern gemeinsam **ST398-A6**. Hier sind keine weiteren epidemiologischen Informationen vorhanden. Isolate aus den Niederlanden sind in vielen Ästen des Baumes vertreten. Sie zeigen eine hohe Divergenz, und es sieht so aus, als könnten sie in diesem Datensatz die ursprüngliche Population darstellen. Die Ergebnisse dieser Daten und des MST lassen die Annahme zu, dass sich in den Niederlanden verschiedenste Genotypen des CC398 entwickeln konnten und es eventuell zur multiplen Verteilung von Isolaten mit niederländischem Ursprung gekommen ist. Unterstützt wird diese These durch den Fakt, dass die Wurzel des Baumes, also die Isolate, die am engsten mit allen bisher untersuchten klonalen Komplexen verwandt sind, ebenfalls ein niederländisches Isolat beherbergt. Dies ist ein Hinweis für den frequenten Austausch von *S. aureus*-CC398 zwischen den Niederlanden und anderen europäischen Ländern und den USA. Dies lässt allerdings nicht den Schluss zu, dass der eigentliche Ursprung dieses Sequenztyps von *S. aureus* in den Niederlanden zu finden ist. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen nur, dass der Verdacht besteht, dass Klone von CC398 aus den Niederlanden in verschiedenste europäische Länder und die USA gelangt sein könnten. Es können keine Subpopulationen direkt mit einzelnen geographischen Gebieten in Zusammenhang gebracht werden. Die geographische Ausbreitung erscheint derzeit schneller als die evolutionsbedingte genomische Veränderung. Anders als bei *Nübel et.al* konnte für diese Arbeit keine globale Auswahl von Isolaten des CC398 untersucht werden. Der Großteil der Isolate stammt aus Deutschland. Die weiteren Isolate sind ungleichmäßig verteilt, berücksichtigen aber einige wichtige europäische Länder mit bekanntem CC398- und hohem Schweinevorkommen. Es handelt sich bei der Isolateauswahl also nicht um eine repräsentative Auswahl der Isolate für geographische Gebiete, sondern um eine Zusammenstellung verfügbarer Isolate unterschiedlicher Spezies und unterschiedlicher Isolationsorte (*convenience sample*). Dabei sind sowohl Isolate aus Infektionen als auch solche von besiedelten Individuen berücksichtigt worden.

In letzter Zeit wurde mehrfach von MSSA-CC398-Isolaten aus Menschen berichtet. Einige Autoren vermuten den Ursprung des CC398 sogar im Menschen [222], [223]. Hinweise dafür

finden *Uhlemann et. al* durch genomweite SNP-Analysen in MSSA-CC398 Proben von Menschen aus Manhattan [223]. Diese hatten teilweise keinerlei Kontakt zu Tieren. Die Autoren gehen von einer Transmission zwischen Menschen verschiedener Haushalte aus. Außerdem verglichen *Uhlemann et. al* die gefundenen MSSA-Isolate mit dem bereits vorher publizierten LA-MRSA Referenzisolat SO385 und konnten Unterschiede im Genom finden. Humane MSSA-CC398-Genome waren kleiner als das Genom von SO385. Tierassoziierte MRSA-CC398 besitzen einige mobile genetische Elemente, die den humanen MSSA fehlen. Außerdem unterscheiden sich ihre Adhäsionsgene voneinander. Die untersuchten MSSA-CC398-Isolate besitzen spezielle Adhäsionsgene, welche eine Bindung an humane Zellkeratinozyten ermöglichen und somit eine optimale Adaptation an den Menschen erlauben. Die humanen MSSA waren alle sensitiv für Tetracykline und besaßen größtenteils den *spa*-Typ t571. CC398-Klone besitzen eine hohe Fähigkeit, sich schnell über weite Räume auszubreiten, und haben sich an das Milieu der Nutztierhaltung sehr gut angepasst. Die Daten geben einen ersten Überblick mit wichtigen Indikationen für neue Forschungsziele. Es sind weitere Untersuchungen über längere Zeiträume und mit Hilfe einer großen Vielzahl und Vielfalt von Isolaten nötig, um genaue Angaben zum geographischen Ursprung des Sequenztyps machen zu können.

### 6.1.2. Wirtsspezifität – tierartsspezifische Cluster?

Charakteristisch für Isolate des CC398 ist eine niedrige Wirtsspezifität [145], [17]. Es können sowohl Menschen als auch Tiere verschiedenster Arten mit *S. aureus*-CC398 besiedelt oder infiziert werden. Obwohl *S. aureus*-Isolate des CC398 anfangs vor allem bei Schweinen nachgewiesen wurden, konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls Nachweise bei Nutztieren, Heimtieren und exotischen Tieren erbracht werden ([25], [63]). Die niedrige Wirtsspezifität zeigt sich in diesem Datensatz vor allem darin, dass verschiedene Spezies mit nicht unterscheidbaren Haplotypen besiedelt sind (siehe Abbildung 8). Zum Beispiel haben Untersuchungen in einer österreichischen Pferdeklinik ergeben, dass Personal und Pferde mit ununterscheidbaren Klonen kolonisiert oder infiziert waren [28]. Diese Isolate finden sich im Cluster A1 der **Sublinie ST398-A** wieder. Auffallend ist, dass 12 Isolate von Pferden in **ST398-A1** (charakterisiert durch den SNP 309-2) zusammen clustern. Zu Beginn der Studie wurde ein „Pferdeeigenes“-Cluster vermutet. Der Fakt, dass auch andere Tierarten im Haplotyp H32 clustern und der Haplotyp H34 ausschließlich aus Isolaten mit gleichem epidemiologischen Zusammenhang besteht, spricht allerdings in diesem Datensatz gegen diese Theorie. Ein nosokomialer Zusammenhang für einzelne Isolate könnte hier vermutet werden. *Mohamed Abdelbary et.al* führten den für diese Dissertation zugrundeliegenden Datensatz weiter und bezogen weitere Isolate von Pferden aus verschiedenen Pferdekliniken

in die Untersuchungen ein. Ein sehr großer Teil all dieser Isolate clusterte in einer Sublinie (hier Sublinie ST398-A1). Der Autor konnte somit neue Hinweise für das Vorliegen einer Sublinie im Bereich der Pferdemedizin sammeln [135]. Außerdem untersuchte er Isolate aus Infektionsgeschehen bei Menschen mit dem *spa*-Typ *t011* auf das Vorhandensein des SNP 309-2 und konnte in der Sammlung des RKI für die Jahre 2010 und 2011 lediglich 4 Isolate finden, welche diese Einzelnukleotidmutation besaßen. Die Vermutung eines tierartspezifischen Clusters liegt ebenfalls bei den Isolaten des Geflügels nahe. Bis auf ein Isolat eines Huhnes sind alle Isolate von Puten in der Sublinie **ST398-F** zu finden. Es handelt sich hier um Puten aus verschiedenen Anlagen. Die Anlagen liegen allerdings nicht weit voneinander entfernt und werden von einem Tierarzt betreut. Die Übertragung via den Vektor Luft oder durch den Tierarzt ist denkbar und wurde für Isolate des CC398 bereits beschrieben [60], [245]. Die Erzeugung von Masttieren aus Elterntieren liegt im Putenbereich in den Händen einiger weniger Konzerne. Es ist durchaus möglich, dass die Masttiere von gleichen Elterntieren stammen und bereits als „carrier“ von CC398 in die Putenanlagen gelangten. Um tierartspezifische Cluster identifizieren zu können, müsste eine große Vielzahl unterschiedlicher Isolate analysiert werden. Eine Wirtsspezifität kann anhand der vorliegenden Daten daher nicht sicher nachgewiesen werden. Es scheint eher so, als hätte dieser Sequenztyp ein großes Potential, verschiedene Tierarten zu kolonisieren bzw. zu infizieren. Welche Eigenschaften dieses *extended host spectrum genotype* (EHSG) [65], CC398 dazu beitragen, sich so erfolgreich an verschiedene Wirte anzupassen, muss in weiteren, auch funktionellen Studien untersucht werden. Die Kolonisation bzw. Infektion von Menschen und Tieren mit *S. aureus* des CC398 scheint bidirektional stattzufinden [222]. *Price et.al* beschrieben, dass durch vollständige Genomanalysen von MSSA und MRSA des CC398 der Ursprung des klonalen Komplexes in humanen MSSA vermutet wird [222]. Sie fanden heraus, dass diese Ursprungs-MSSA mit Phagen ausgestattet waren, die für humane Immunmodulatoren kodieren. Die untersuchten Tierisolate wiesen diese Phagen nicht auf. Des Weiteren vermuten sie, dass die Tetrazyklin- und Methicillinresistenz erst bei der Entwicklung zum *livestock*-assoziierten *S. aureus* erworben wird [222]. Die von *Uhlemann et.al* beschriebene Möglichkeit zum Interagieren von humanen MSSA-CC398 mit Keratinozyten und nasalen Epithelzellen ist sehr entscheidend für die Kolonisation und Infektion von Menschen und lässt eine gewissen Wirtsadaptation vermuten [223]. *Mohamed Abdelbary et. al* fanden heraus, dass alle Putenisolate einen vogel-spezifischen Prophagen ( $\phi$ AV $\beta$ ) besitzen. Sie nehmen an, dass sich Klone des CC398 durch Aufnahme dieses Phagen an den Wirt Pute adaptierte [135]. Neueste Untersuchungsmethoden wie *whole-genome sequencing* könnten die bisher gesammelten Daten ergänzen und verfeinern.

### 6.1.3. *spa*-Typen, SCCmec, Verteilung MSSA - MRSA

Betrachtet man die bereits veröffentlichten Daten der nationalen und internationalen Literatur zu beschriebenen *spa*-Typen von *S. aureus*-CC398 sowohl bei Tieren als auch beim Menschen, so wird deutlich, dass ein Großteil der Isolate den Typen *t011* und *t034* zuzuordnen sind [13], [17], [59], [146]). Ebenfalls gehören die Isolate dieser Studie zum großen Teil diesen beiden *spa*-Typen an. Diese sind eng miteinander verwandt und unterscheiden sich lediglich durch zwei Repeats. Im *spa*-Typen *t034* ist die Repeatregion 02-25 im Gegensatz zum Typ *t011* einfach verdoppelt. Man könnte aber auch annehmen, dass der *spa*-Typ *t011* sich durch Verlust dieses Repeats aus dem Typen *t034* entwickelte [25]. Die Isolate von Menschen und Tieren im MST sind anhand des *spa*-Typen nicht voneinander unterscheidbar. Dies wird gleichzeitig in der Studie von Denis et al. beschrieben [144]. Alle im MST gefundenen *spa*-Typen können als Varianten des *t034* angesehen werden. Zum überwiegenden Teil clustern homogene Gruppen mit *spa*-Typen *t011* oder *t034* zusammen. Fast alle der hier gefundenen *spa*-Typen beginnen mit dem Repeat 08 und enden mit dem Repeat 25 (Ausnahme *t899*). Wie in anderen Studien bereits beschrieben weist ein Großteil der Isolate entweder SCCmec-Elemente des Typs IV oder V auf. Die Daten zeigen, dass diese Isolate mit gleichem SCCmec-Element meist eng benachbart clustern. SCCmec IV ist eines der kleinsten aller SCCmec-Elemente. Einige Autoren sehen dieses kleine, weltweit in *S. aureus* vorkommende Element als spezifisches Transportvehikle für die Methicillinresistenz an [104], [88]. Im MST clustern diese Isolate bis auf eine Ausnahme alle in der Sublinie **ST398-A1**. Am häufigsten sind allerdings Isolate mit Elementen des Typs V vertreten. Diese befinden sich weit verteilt im MST (siehe Abbildung 10). In letzter Zeit findet man zunehmend Isolate mit anderen SCCmec-Elementen sowie Isolate mit nicht typisierbaren Elementen. Jansen et al. machten in einer Publikation darauf aufmerksam, dass durch unterschiedliche SCCmec-Typisierungsmethoden fälschlicherweise SCCmec-Elemente in CC398 Isolaten fehltypisiert werden könnten [246]. Van Loo et al. beschrieben Isolate des CC398 mit Elementen des Typs III [207]. Diese Isolate wurden mit der Methode nach Zhang et al. untersucht. Dabei wird die Kasette III durch die Amplifikation eines 280 bp großen Fragments, welches in der J-Region lokalisiert ist, definiert. Jansen et al. machen darauf aufmerksam, dass dieses Fragment nicht unbedingt charakteristisch für das Vorhandensein eines III. Elements ist. Sie untersuchten alle Isolate mit „*ccr*“ spezifischen Primern und konnten keine Isolate mit Elementen des Typs III finden. Sie fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass diese Isolate alle eine SCCmec V tragen [246]. In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Datensatz ist ebenfalls ein Isolat mit einer Kasette des Typs III vorhanden. Die SCCmec-Typisierung fand hier ebenfalls nicht mit „*ccr*“ spezifischen Primern nach Zhang et al. statt und sollte für in Zukunft untersuchte Isolate ergänzt werden. Überall

verteilt im Baum und bei allen Spezies, mit Ausnahme der Sublinie **ST398-A1** findet man MSSA. Dies zeigte, dass die Evolution unabhängig vom Vorhandensein einer SCCmec-Elementes stattfindet. Diese MSSA können Vorfahren von MRSA sein oder sie haben sekundär SCCmec verloren. SCCmec-Elemente hinterlassen, wenn sie aus dem *S. aureus*-Genom entfernt werden, nicht immer Überreste oder Narben [247], [228]. Daher gibt es bisher auch keine PCR-Methode, mit der sicher nachgewiesen werden kann, dass ein Stamm nie zuvor SCCmec besaß. Die Untersuchungen mittels Microarrayverfahren geben Hinweise auf vorhandene Gene. Innerhalb der verwendeten Isolate konnte ein Isolat als MRSA identifiziert werden, und ein Isolat wies auf das Vorhandensein von Resten von SCCmec hin. Um Gewissheit zu haben, ob und welche eventuellen Reste vorliegen, müsste man die jeweilige Region sequenzieren.

#### **6.1.4. Nachweis von Synonymen und Nicht-synonymen Substitutionen und demographische Analyse der Populationsgröße**

Die Geschwindigkeit, mit der sich genetische Veränderungen in Populationen pathogener Bakterien niederschlagen, ist ein Schlüsselparameter für das Verständnis von Merkmalen wie erhöhte Virulenz oder Antibiotikaresistenzen. Die am weitesten verbreiteten Typen von Sequenzvariationen im bakteriellen Genom sind SNPs. Die Untersuchungen von genomweiten SNPs gestaltet sich in jungen Taxa wie zum Beispiel *Yersinia pestis* oder *Salmonella Typhi* auf Grund ihrer selteneren genomischen Variationen schwierig. Um Messfehler bei der Suche nach SNPs zu vermeiden, sollte man die Populationsstruktur möglichst in großen, globalen Stammkolektionen untersuchen. Das war in dieser Arbeit nur eingeschränkt möglich. Die Zusammenstellung der verwendeten Stämme erfolgte ungerichtet und nicht ausgewogen. Stammdaten konnten nicht aus allen Ländern, in denen MRSA-CC398 bisher auftrat, verarbeitet werden. Die Nukleotiddiversität  $\pi$  beträgt für die zugrundegelegte Population  $0,00008 \pm 0,00001$  und ist somit sehr niedrig. Der Wert liegt zwischen den bereits für ST5 und ST225 ermittelten Diversitätswerten [110], [239]. Das Ergebnis besagt, dass die Evolutionsrate in ST398 offenbar etwas höher ist als in bereits untersuchten Sequenztypen von *S. aureus* wie ST5 und ST225 [239]. Das Verhältnis von  $Ks/Ka$  beträgt 0,283. Verhältnisse kleiner als 1 weisen darauf hin, dass eine Population Zeit hatte, Mutationen auszuwählen. Es kommt zu einer Abnahme Nicht-synonymer Mutationen im Genom. Einige Autoren sprechen hier von säubernder Selektion (*purifying selection*) [110], [237]. Vergleichbare Werte konnten für *Salmonella enterica* Serovar Typhi errechnet werden. Hier betragen  $Ks/Ka$  0,17 [242]. Der Anteil Nicht-synonymer Mutationen und Synonymer Mutationen ist fast ausgeglichen. Es konnten bereits schädigende Mutationen aus dem Genom entfernt werden. Um eine genaue Aussage für CC398 machen

zu können, sollten weitere Isolate in die Untersuchungen einbezogen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine schnelle, klonale Evolution von *S. aureus* hin. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass dieser Klon zwischen 1988 und 1997 entstanden sein müsste. Die Entstehung ist damit einige Jahre bevor CC398 überhaupt Beachtung fand und in Schweinen nachgewiesen wurde, datiert. Die Vermutung, dass es sich bei MRSA-CC398 nicht um ein neues, sondern um ein bisher einfach nicht wahrgenommenes Problem handeln könnte, beschreiben schon *Blaha et. al* in einer Studie im deutschen Tierärzteblatt [248]. Eine französische Publikation spricht von Isolaten, welche vor der Erstentdeckung in 2003 in den Niederlanden isoliert wurden (zwischen 1996 und 2002). Ein genaues Entnahmedatum der hier untersuchten MSSA-CC398 bei Schweinen wird allerdings nicht angegeben [55]. *Price et. al* beschrieben kürzlich, dass es Hinweise dafür gibt, dass *livestock-associated* MRSA aus MSSA in humanen Wirten (ancestrale Population des CC398) hervorgebracht wurden [222]. Um diese These zu untermauern oder zu widerlegen, sollte man weitere humane Isolate aus der Zeit vor Entdeckung der *livestock-associated* MRSA mittels *dHPLC* untersuchen.

#### **6.1.5. Transmissionsstudie**

Ziel der Studie war es zu prüfen, ob eine Transmission zwischen den Schweinen, den Landwirten und des Personals stattgefunden hat. Nimmt man die beiden untersuchten Betriebe nochmals näher in Augenschein, wird schnell deutlich, dass die Stämme nicht übereinstimmend sind.

Zu den unterschiedlichen Zeitpunkten waren zumindest die Landwirte mit verschiedenen Haplotypen von *S. aureus*-CC398 besiedelt. Betrachtet man die Isolate des Betriebes 2 lediglich auf Ebene der *spa*-Typen (alle *t011*), könnte man annehmen, dass sowohl das Personal als auch der Landwirt und dessen Schweine mit ein und demselben Klon über einen Zeitraum von mindestens 2 Jahren besiedelt waren. Dies wird aber auf genotypischer Ebene widerlegt oder besser gesagt konkretisiert. Die Analyse der Einzelnukleotidpolymorphismen ist sehr viel genauer. Die Methode erlaubt einen tieferen Einblick in die genetischen Besonderheiten dieses Klons und zeigt, dass durchaus gegensätzliche Annahmen getroffen werden können, wenn man unterschiedliche molekulargenetische Tools verwendet. Der Landwirt des Betriebes 3 wies in der ersten Untersuchung ein Isolat mit dem *spa*-Typen *t011* in seiner Nase auf. In drei Nachfolgeuntersuchungen wurde ein Isolat mit *spa*-Typen *t034*, ein negatives Ergebnis nach Sanierung und dann ebenfalls ein Isolat des *spa*-Typen *t034* gefunden. Der Haplotyp änderte sich von H35 zu H31 und zu H30 in der letzten Kontrolle.

Die zeitnah beprobten Schweine wiesen stetig Isolate des *spa*-Typen *t034* auf, die dem Haplotypen H30 und darauffolgend dem Haplotypen H35 angehörten. Zu den unterschiedlichen Zeitpunkten müssen in diesem Fall neue Besiedlungen durch andere Haplotypen stattgefunden haben. Es ist bekannt, dass *S. aureus* sich durch Mutation verändern kann. Rückmutationen eines Gens finden aber nur in geringstem Maße statt (1:1000000) [249]. Berücksichtigt man den relativ kurzen Zeitabstand zwischen den Probennahmen und die Unwahrscheinlichkeit des Eintretens dieses Ereignisses, kann man davon ausgehen, dass zumindest in diesem Fall eine Mutation im betroffenen Individuum ausgeschlossen werden kann. Es ist eher wahrscheinlich, dass eine Neu- oder Re-Besiedlung durch andere Haplotypen der Schweine, der Umgebung oder des vorhandenen Staubes im Stall stattgefunden haben muss.

Die Studie zeigt weiterhin, dass verschiedene Genotypen auf Betriebsebene (Farmlevel) vertreten sind und diese auch in den unterschiedlichen Wirtspopulationen (Mensch, Tier, Umgebung) verbreitet sind. Die gefundenen Einzelnukleotidpolymorphismen, die in deutschen Isolaten gefunden wurden, weisen auf multiple Haplotypen innerhalb des Landes und auch in einzelnen landwirtschaftlichen Unternehmen hin. Dass Menschen, die mit Schweinen arbeiten (Landwirte, Tierärzte und Schlachthofpersonal), ein erhöhtes Expositionsrisiko, mit MRSA des CC398 besiedelt zu werden, haben, ist bereits mehrfach nachgewiesen worden [21], [250]. Die These der Besiedlung durch Staub wurde und wird mittlerweile mehrfach untersucht [251], [252]. Daten aus einem Vortrag des Institutes für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover in Kooperation mit dem Institut für Tier- und Umwelthygiene, Freie Universität Berlin in Dresden 2010 zeigten, dass eine hohe Prävalenz von MRSA CC398 in Sockentupferproben aus Schweinemastbeständen nachgewiesen werden konnte („MRSA in der Nutztierhaltung“, Schulz, Rösler, Hartung). Die Verbreitung via Staub macht eine Vielzahl an Transmissionswegen für *S. aureus* möglich. Derzeit widmen sich mehrere Studien der tierärztlichen Hochschulen Hannover und der FU Berlin sowie des BfRs und einiger Landesuntersuchungsämter gemeinsam in einem Verbundvorhaben „MRSA in Nutztierhaltungen“, gefördert durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, der weiteren Erforschung möglicher Transmissionswege. Eine der wichtigsten zu klärenden Fragen ist die, ob jede neue Schweinelieferung auch einen neuen Haplotypen von *S. aureus*-CC398 mitbringt oder ob ein etwa gleichbleibendes Milieu eines schweinehaltenden Betriebes einen sich nur langsam entwickelnden Klon beherbergt. Diese kleine Studie gibt Anhaltspunkte, wie man weitere Informationen sammeln kann. Sie zeigt, dass die Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen viel genauer ist als die einzelne Betrachtung von *spa*-Typen, *SCCmec* oder von Antibiogrammen. Leider ist es anhand dieser Studie nicht möglich, Aussagen zu potentiellen Transmissionswegen von *S. aureus*-CC398 zu machen. Es wäre

nötig, über längere Zeiträume einzelne abgeschlossene Kompartimente, wie z.B. einzelne Stallanlagen, zu beobachten und zu untersuchen. Des Weiteren eignen sich genomweite SNP-Analysen, wie in der Dissertation von *Dordel* beschrieben, um Transmissionswege darzustellen [244]. Weitere Untersuchungen sollten klären, ob die verschiedenen auftretenden Haplotypen das Resultat der ständig wechselnden Schweinepopulation eines Betriebes sein könnten oder ob die Besiedlungen der betroffenen Personen nur zeitweise Besiedlungen durch die Aufnahme des Stallstaubes sind.

#### **6.1.6. Pulsfeldgelelektrophorese**

Ein einfacher, aussagekräftiger Vergleich der zwei unterschiedlichen Methoden *dHPLC* und PFGE ist anhand der Auswahl der untersuchten Isolate nicht möglich.

Man könnte annehmen, dass die Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen genauer zu sein scheint als die Analyse mittels Restriktionsenzymen in der PFGE. Weitere SNP-Untersuchungen und die Einbeziehung weiterer Isolate und Loci sind nötig, um die Genauigkeit der Methode einzuschätzen und mit der PFGE eindeutig zu vergleichen. Der Fakt, dass man einen Ausschnitt unterschiedlicher Loci des Genoms betrachtet bzw. die Restriktionsenzyme der PFGE nur an bestimmten Stellen schneiden, muss natürlich berücksichtigt werden. Bisher wurden keine vergleichenden Arbeiten zu diesem Thema vorgelegt.

#### **6.1.7. Ausbreitung von MRSA des CC398**

Die mehrmals angesprochene schnelle Ausbreitung könnte im Zusammenhang mit dem weltweiten Handel von Ferkeln und Mastschweinen stehen. In den letzten 10 Jahren kam es zu Umstrukturierungen in der Schweinehaltung, die sich oftmals auch auf die Produktion auswirkte. Durch zunehmende Globalisierung erschlossen sich weitere Märkte zum Absatz von Ferkeln, Sauen, Mastschweinen oder Schweinefleisch und deren Produkten. Dass die Transmission von MRSA-CC398 auch durch den Handel mit Schweinen beeinflusst wird, zeigt eine Studie von *Espinosa-Gongora et. al* [253]. Sie untersuchten Schweine beim Lieferanten und im Käuferbestand und fanden nicht unterscheidbare PFGE-Muster. Andere Autoren nehmen an, dass der Handel mit Ferkeln eine Möglichkeit der Transmisson von *S. aureus* zwischen Farmen darstellt [254], [255]. Vielleicht ist es möglich, in den nächsten Jahren den Schweinehandel weiter zu untersuchen. Mithilfe des Tracesprogramms ([www.webgate.ec.europa.eu](http://www.webgate.ec.europa.eu)) ist schon jetzt eine lückenlose Dokumentation aller ins Ausland gelieferten Schweine möglich. Deutschland gehört zu den Ländern, die gravierend am Import und Export beteiligt sind und liegt europaweit sogar an der Spitze der Exportländer. Es gibt Bestrebungen in Deutschland (FLI), die Handelsnetze von Schweinen weitergehend zu

erforschen, zu speichern und zurückzuverfolgen (Vortrag 09.11.2011, Tierseuchentag M-V). In den nächsten Jahren sollen diese Handelsnetze eine epidemiologische Verfolgung von Krankheiten unterstützen und möglich machen.

Erstaunlich ist, dass bisher in alternativen Haltungssystemen (Öko- oder Biohaltung) kaum *S. aureus*-CC398 nachweisbar waren. Eine Studie von *Cuny et. al* gibt an, dass in 178 Schweinenasen-tupferproben aus 25 Haltungen kein *S. aureus* isoliert werden konnte [256]. Die Arbeit von *Heine* beschreibt niedrigere Prävalenzen in Ökobetrieben als in konventionellen Schweinehaltungen [252]. Die Autorin gibt außerdem an, dass die Prävalenz zunimmt, je größer die Herden sind [252].

Um Aussagen über die Mikroevolution von humanen MSSA-CC398-Isolaten machen zu können, sollte eine Auswahl an Isolaten in ähnliche Berechnungen einbezogen werden. Bedingt durch eine veränderte genetische Ausstattung sollten diese Isolate eigene Cluster in MSTs bilden.

Die vorliegenden Daten verdeutlichen die Komplexität der Transmission von *S. aureus*-CC398. Die schnelle Verbreitung von *S. aureus*-CC398 könnte durch den Import und Export von Ferkeln und Masttieren mitbedingt sein. Deshalb spielt ein Monitoring des Marktes und das Erfassen von Handelswegen (z.B. via Traces) eine große Rolle. Spezialisierte Systeme haben einen hohen Schweinedurchsatz, und es wäre möglich, dass jede neue Charge mit einem anderen Haplotypen *S. aureus*-CC398 besiedelt ist. Die Gabe von Antibiotika in Mastbetrieben verschärft die Situation zunehmend [255], [257]. Die wichtigsten Maßnahmen im Kampf gegen resistente *S. aureus* sind neben einem etablierten Monitoring die weitergehende Erforschung dieser Erreger und der Entwicklung der MRSA-Situation in Europa sowie weltweit (EUREGIO MRSA-net Projekt, Zoonose und Antibiotikamonitoring der Efsa, Programm MedVetStaph u.a.). Es ist notwendig, dass die konsequente Anwendung der Leitlinien zum sorgfältigen Umgang mit mikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln (Antibiotika-Leitlinien, Beilage zum Deutschen Tierärzteblatt 2013) eingehalten wird. Bakterielle Erkrankungen sollten diagnostisch akkurat ermittelt werden, um das korrekte und wirksamste Antibiotikum anzuwenden. Außerdem sollten Alternativen zur Antibiotikaaanwendung zum Einsatz kommen, wenn dies möglich ist. Weitere Erkenntnisse über die Verwandtschaftsverhältnisse pathogener Erreger sowie die Erforschung ihrer Transmission sind wichtige Werkzeuge der Surveillance von Infektionskrankheiten und werden in den nächsten Jahren helfen, weitere Rätsel von *S. aureus* zu enthüllen.

## 7. Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren wurde vermehrt von Methicillin-resistenten *S. aureus* in der Human- und Veterinärmedizin berichtet. Seit 2005 wird insbesondere der klonale Komplex 398 (CC 398) bei Nutztieren und auch bei Menschen mit Kontakt zu diesen beschrieben. Das Auftreten dieses Pathogens führte zur Frage, wie es zur Wirtsanpassung kommt und welche Pathopotenzen von *S. aureus*-CC398 ausgeht. Vor allem der evolutionäre Hintergrund ist daher von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Populationsstruktur mittels Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP)-Analyse dargestellt. In einer multinationalen Auswahl an Isolaten aus Deutschland, Belgien, Österreich, dem Vereinigten Königreich, den USA, den Niederlanden und Italien konnten 100 Genloci (vorwiegend Haushaltsgene) in 112 Isolaten von *S. aureus* des CC398 untersucht werden. Es wurden Isolate von Menschen, Schweinen, Pferden, Rindern, Geflügel, Hunden, der Umgebung der Tiere, einer Ziege und einer Katze ausgewählt. Zur Detektion von SNPs wurde die *denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC)* genutzt. Polymorphe PCR-Produkte wurden anschließend an die dHPLC-Detektion sequenziert. Die Datenanalyse und das Erstellen eines Minimum-Spanning-Trees wurden mithilfe der Software Bionumerics 5.0 ausgeführt. Auf Basis der gefundenen SNPs konnten Details über die Entstehung und mögliche geographische Verbreitung von MRSA in kommerziell gehaltenen Schweinen und anderen Tieren sowie exponierten Menschen deutlich gemacht werden. Insgesamt wurden 60 SNPs in 41,199 untersuchten Basenpaaren des Genoms (1,5%) detektiert. Basierend auf den 60 SNPs wurden die Isolate in 36 Haplotypen gegliedert. Es konnte gezeigt werden, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten einzelne Haplotypen in verschiedenen Ländern vorkamen. Einige Isolate clustern entsprechend ihrem geographischen Hintergrund zusammen. Wirtsspezifität konnte nicht belegt werden.

Eine Transmissionsstudie in 2 landwirtschaftlichen Betrieben sollte Aufschlüsse über die Übertragung zwischen Mensch und Schwein und umgekehrt geben. Anhand von Haplotypenstudien und den Nachweis gleicher Haplotypen konnte tatsächlich belegt werden, dass Transmission zwischen Schweinen und exponierten Personen (hier Landwirt und Personal) stattfindet. Die Ergebnisse weisen ferner daraufhin, dass die untersuchten Landwirte zu verschiedenen Zeitpunkten mit unterschiedlichen Haplotypen des CC398 besiedelt bzw. infiziert waren. Es konnte gezeigt werden, dass die Analyse mittels SNPs genauere Ergebnisse für Transmissionsstudien liefern kann als z.B. die *spa*-Analyse allein. In der Zukunft wird die Erforschung von Evolutionsprozessen mittels Sequenzierung von Genloci und vollständigen Genomen eine wichtige Rolle in der mikrobiellen Diagnostik spielen.

## 8. Summary

### ***“Population structure of methicillin resistant S.aureus CC398 in humans and livestock”***

Over the last years, more and more infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have been detected in human and veterinary medicine.

Since 2005, the clonal complex 398 (CC398) is described in livestock and also in humans with exposure to colonized animals. The emergence of this pathogen leads to the question of host adaptation and pathopotency. The evolutionary origin of CC398 in particular is of greater interest. This study deals with the population structure of CC398 by using SNP-analysis. We investigated the population structure of CC398 detecting mutations among 100 housekeeping genes of 112 isolates. This convenience collection included strains from Germany, Belgium, Austria, the United Kingdom, the USA, the Netherlands and Italy. Isolates of humans, pigs, horses, cattle, poultry, dogs, environment, a goat and a cat were chosen.

The *dHPLC* method was employed and resulting polymorphic PCR products were sequenced subsequently. Data analysis and the construction of a minimum spanning tree were performed by use of Bionumerics 6.0. On the basis of occurring polymorphisms, details about the emergence and geographic spread of MRSA in pigs and other animals and their relationship to MRSA causing infections in humans were displayed. In total, 60 SNPs, representing approximately 1, 5% (41.199bp) of the whole *S. aureus*-genome, were analysed and 36 haplotypes were differentiated among the 102 strains. The data showed that different haplotypes appeared at different times in various countries. In addition, some isolates clustered according to their geographic origin. Isolates from middle Europe seem to be more diverse. Here, an exclusive host specificity for certain haplotypes was not detected.

A transmission study on two farms was performed in order to get insights into the dynamics of CC398-transmission from human to pigs and vice versa. Transmission of certain haplotypes between pigs and humans seems to be evident according to the resulting data. However, farmers were found to be colonized with different haplotypes during the study period. This study supports that SNP-analysis is a more exact tool for transmission studies than *spa*-analysis alone. In the future, research on evolutionary processes using sequencing methods of selected genloci or whole genomes will play an important role.

## 9. Referenzen

1. Shorr A.F. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* prolongs intensive care unit stay in ventilator-associated pneumonia, despite initially appropriate antibiotic therapy. *Crit Care Med*, 2006. 34(3): p. 700-6.
2. Klein E., Smith D.L., and Laxminarayan R., *Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus, United States, 1999-2005*. *Emerg Infect Dis*, 2007. 13(12): p. 1840-6.
3. Hiramatsu K. et al., *The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 2001. 9(10): p. 486-93.
4. Devriese L.A., Van Damme L.R., and Fameree L., *Methicillin (cloxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis cases*. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1972. 19(7): p. 598-605.
5. Baptiste K.E. et al., *Methicillin-resistant staphylococci in companion animals*. *Emerg Infect Dis*, 2005. 11(12): p. 1942-4.
6. Catry B. et al., *Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health*. *Epidemiol Infect*, 2010. 138(5): p. 626-44.
7. Cuny C. et al., *Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in different animal species*. *Int J Med Microbiol*, 2010. 300(2-3): p. 109-17.
8. Faires M.C., Tater K.C. and Weese J.S., *An investigation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in people and pets in the same household with an infected person or infected pet*. *J Am Vet Med Assoc*, 2009. 235(5): p. 540-3.
9. Loeffler A. et al., *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK*. *J Antimicrob Chemother*, 2005. 56(4): p. 692-7.
10. Strommenger B. et al., *Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from pet animals and their relationship to human isolates*. *J Antimicrob Chemother*, 2006. 57(3): p. 461-5.
11. Weese J.S. et al., *Suspected transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household*. *Vet Microbiol*, 2006. 115(1-3): p. 148-55.
12. Weese J.S. and van Duijkeren E., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine*. *Vet Microbiol*, 2010. 140(3-4): p. 418-29.
13. de Neeling A.J. et al., *High prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aureus in pigs*. *Vet Microbiol*, 2007. 122(3-4): p. 366-72.
14. Wulf M.W. et al., *First outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in a Dutch hospital, June 2007*. *Euro Surveill*, 2008. 13(9).
15. Fanoy E. et al., *An outbreak of non-typeable MRSA within a residential care facility*. *Euro Surveill*, 2009. 14(1): p. 19080 - 19085.
16. Deurenberg R.H. et al., *Cross-border dissemination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Euregio Meuse-Rhin region*. *Emerg Infect Dis*, 2009. 15(5): p. 727-34.
17. Lewis H.C. et al., *Pigs as source of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 infections in humans, Denmark*. *Emerg Infect Dis*, 2008. 14(9): p. 1383-9.
18. Rasigade P.P. et al., *Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 Staphylococcus aureus strain*. *Emerg Infect Dis*, 2010. 16(8): p. 1330.
19. Etienne J., *Panton-Valentine leukocidin: a marker of severity for Staphylococcus aureus infection?* *Clin Infect Dis*, 2005. 41(5): p. 591-3.
20. Kehrenberg C. et al., *Methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene cfr*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(2): p. 779-81.

21. Cuny C. et al., *Nasal colonization of humans with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs*. PLoS One, 2009. 4(8): p. e6800.
22. van Cleef B.A. et al., *Prevalence of livestock-associated MRSA in communities with high pig-densities in the Netherlands*. PLoS One, 2010. 5(2): p. e9385.
23. Witte W. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in humans and animals, Central Europe*. Emerg Infect Dis, 2007. 13(2): p. 255-8.
24. Voss, A. et al. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming*. Emerg Infect Dis, 2005. 11(12): p. 1965-6.
25. Vanderhaeghen W. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in food production animals*. Epidemiol Infect, 2010: p. 1-20.
26. Mulders M.N. et al., *Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands*. Epidemiol Infect, 2010: p. 1-13.
27. Fessler A. et al., *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from cases of bovine mastitis*. J Antimicrob Chemother, 2010.
28. Cuny C. et al., *Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital*. Microb Drug Resist, 2008. 14(4): p. 307-10.
29. Schmitt W., *Robert Koch; man and work (author's transl)*. Zentralbl Chir, 1982: p. 107(5-6): p. 251-9.
30. Ogston A., *Micrococcus poisoning*. J Anat Physiol, Oct 1882. 17(Pt 1):: p. 24–58.
31. Hahn H., *Staphylokokken*. Medizinische Mikrobiologie., 1991. F. Hahn, Klein. Berlin, Heidelberg, New York, Springer - Verlag.
32. Smith S.M., Eng R.H., Padberg F.T., *Survival of nosocomial pathogenic bacteria at ambient temperature*. J. Med. Microbiol, 1996. 27: p. 293-302.
33. Marples R.R., Richardson J.F., Newton F.E., *Staphylococci as part of the normal flora of human skin*. 1990 (Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 19): p. 93S-99S.
34. Valle J., Piriz S., de la Fuente R., Vadillo S., *Staphylococci isolated from healthy goats*. 1991. B. 38(Zentralbl. Veterinärmed.): p. 81-89.
35. Barber M., *Methicillin-resistant staphylococci*. J Clin Pathol, 1961. 14: p. 385-93.
36. Musher D.M., Lamm N., Darouiche R. O., Young E.J., Hamill R.J., Landon G.C., *The current spectrum of Staphylococcus aureus infection in a tertiary care hospital. Medicine (Baltimore)*. 1994. 73: p. 186-208.
37. Grundmann H. et al., *Emergence and resurgence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat*. Lancet, 2006. 368(9538): p. 874-85.
38. Chambers H.F., *The changing epidemiology of Staphylococcus aureus?* Emerg Infect Dis, 2001. 7(2): p. 178-82.
39. Declercq P. et al., *Complicated community-acquired soft tissue infection by MRSA from porcine origin*. Infection, 2008. 36(6): p. 590-2.
40. Coombs G.W. et al., *Prevalence of MRSA strains among Staphylococcus aureus isolated from outpatients, 2006*. Commun Dis Intell, 2009. 33(1): p. 10-20.
41. Carrillo-Marquez M.A. et al., *Clinical and molecular epidemiology of Staphylococcus aureus catheter-related bacteremia in children*. Pediatr Infect Dis J, 2010. 29(5): p. 410-4.
42. Nace H., Lorber B., *Successful treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus endocarditis with telavancin*. J Antimicrob Chemother, 2010. 65(6): p. 1315-6.
43. Tang, Y.W., et al., *Characterization of three Staphylococcus aureus isolates from a 17-year-old female who died of tampon-related toxic shock syndrome*. J Clin Microbiol, 2010. 48(5): p. 1974-7.
44. Varghese B. et al., *Toxic shock syndrome caused by hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a patient with pancytopenia*. Crit Care Resusc, 2010. 12(1): p. 50-2.
45. Mikkelsen C.S. et al., *[Staphylococcal scalded skin syndrome in adults]*. Ugeskr Laeger, 2010. 172(9): p. 717-9.

46. Rosec J.P., Guiraud J.P., Dalet C., Richard N., *Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France*. 1997. 35(Int. J. Food Microbiol): p. 213-221.
47. Robert-Koch-Institut, *Erkrankungen durch Staphylokokkus aureus unter Berücksichtigung der MRSA*. 2000(Epidemiologisches Bulletin): p. 62-65.
48. McCarthy N.L. et al., *Health care-associated and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: A comparison of definitions*. Am J Infect Control, 2010.
49. Manian F.A., Meyer P.L., Setzer, J. Senkel D., *Surgical site infections associated with methicillin-resistant Staphylococcus aureus: do postoperative factors play a role?* Clin. Infect. Dis., 2003. 36:: p. 863-868.
50. Enright M.C. et al., *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(11): p. 7687-92.
51. Witte W. et al., *Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals*. Clin Microbiol Infect, 1997. 3(4): p. 414-422.
52. Udo E.E., Pearman J.W., Grubb W.B., *Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Western Australia*. J Hosp Infect, 1993. 25(2): p. 97-108.
53. Witte W., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: what do we need to know?* Clin Microbiol Infect, 2009. 15 Suppl 7: p. 17-25.
54. Seybold U. et al., *Emergence of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections*. Clin Infect Dis, 2006. 42(5): p. 647-56.
55. Armand-Lefevre L., Ruimy R., Andremont A., *Clonal comparison of Staphylococcus aureus isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs*. Emerg Infect Dis, 2005. 11(5): p. 711-4.
56. Golding G.R. et al., *Livestock-associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Sequence Type 398 in Humans, Canada*. Emerg Infect Dis, 2010. 16(4): p. 587-594.
57. Meemken, D., et al., *Livestock Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (LaMRSA) Isolated from Lesions of Pigs at Necropsy in Northwest Germany Between 2004 and 2007*. Zoonoses Public Health, 2009.
58. Nemati M. et al., *Antimicrobial resistance of old and recent Staphylococcus aureus isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. 52(10): p. 3817-9.
59. van Duijkeren E. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks*. Vet Microbiol, 2010. 141(1-2): p. 96-102.
60. Tenhagen B.A., Fetsch A., Bräunig J., Käsbohrer A., *Methicillin-resistente Staphylococcus aureus (MRSA) von Nutztieren*. Dt. Tierärzteblatt, 2008. 9: p. 1177-1181.
61. van Loo I.H. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat products, the Netherlands*. Emerg Infect Dis, 2007. 13(11): p. 1753-5.
62. Lozano C. et al., *Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in food samples of animal origin in Spain*. J Antimicrob Chemother, 2009. 64(6): p. 1325-6.
63. Walther B. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations*. Vet Microbiol, 2008. 127(1-2): p. 171-8.
64. Mammina C. et al., *Ventilator-associated Pneumonia and MRSA ST398, Italy*. Emerg Infect Dis, 2010. 16(4): p. 730-1.
65. Walther B. et al., *Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2009. 47(3): p. 704-10.
66. Gordon R.J., Lowy F.D., *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Clin Infect Dis, 2008. 46 Suppl 5: p. S350-9.

67. Foster T.J., *Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion*. Vet Dermatol, 2009. 20(5-6): p. 456-70.
68. Tang Y.W., Stratton C.W., *Staphylococcus aureus: An Old Pathogen with New Weapons*. Clin Lab Med, 2010. 30(1): p. 179-208.
69. Bergmann S., Hammerschmidt S., *Fibrinolysis and host response in bacterial infections*. Thromb Haemost, 2007. 98(3): p. 512-20.
70. Nishifuji K., Sugai M., Amagai M., *Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals*. J Dermatol Sci, 2008. 49(1): p. 21-31.
71. Shallcross L.J. et al., *Panton Valentine Leukocidin associated Staphylococcal Disease: A Cross Sectional Study at a London Hospital, England*. Clin Microbiol Infect, 2009: p. 1644-8.
72. Perbet S. et al., *Multifocal community-acquired necrotizing fasciitis caused by a Panton-Valentine leukocidin-producing methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*. Infection, 2010: p. 223-5.
73. Matsuda Y. et al., *Diagnosis of toxic shock syndrome by two different systems; clinical criteria and monitoring of TSST-1-reactive T cells*. Microbiol Immunol, 2008. 52(11): p. 513-21.
74. Lappin E., Ferguson A.J., *Gram-positive toxic shock syndromes*. Lancet Infect Dis, 2009. 9(5): p. 281-90.
75. Kayser F.H., *Ursprung und Evolution der Antibiotikaresistenz*. Verein Forschung für Leben. Zürich., 1998. Nr. 51.
76. Peters G., Becker K., *Epidemiology, control and treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Drugs., 1996. 52 Suppl 2: p. 50-54.
77. Pinho M.G., de Lencastre H., Tomasz A., *An acquired and a native penicillinbinding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 2001. 98: : p. 10886-10891.
78. Chambers H.F., *Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications*. Clin Microbiol Rev, 1997. 10(4): p. 781-91.
79. Deurenberg R.H. et al., *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect, 2007. 13(3): p. 222-35.
80. Wielders C.L. et al., *In-vivo transfer of mecA DNA to Staphylococcus aureus [corrected]*. Lancet, 2001. 357(9269): p. 1674-5.
81. Berisio R., Schluenzen F., Harms J., Bashan A., Auerbach T., Baram D., Yonath A., *Structural insight into the role of the ribosomal tunnel in cellular regulation*. Nat. Struct. Biol., 2003. 10: p. 366-370.
82. Skurray R.A., Firth N., *Molecular evolution of multiply-antibiotic-resistant staphylococci*. Ciba Found Symp, 1997. 207: p. 167-83; 183-91.
83. Martineau F., P.F., Lansac N., Ménard C., Roy P.H., Ouellette M, Bergeron MG., *Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother. , 2000, Feb. 44(2):: p. 231-8.
84. Geiss H., Mack D., Seifert H., *Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und Interpretation von Ergebnissen der Antibiotika Empfindlichkeitstestung bei grampositiven und gramnegativen Erregern*. Chemotherapie Journal., 2004. 13: : p. 1-16.
85. Wondrack L. et al., *Clinical strain of Staphylococcus aureus inactivates and causes efflux of macrolides*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. 40(4): p. 992-8.
86. Geisel R., *Resistenzphänotypen und -genotypen bei Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus Isolaten*. Chemotherapie Journal., 2003. 12:: p. 122-31.
87. Lyon B.R., Skurray R., *Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis*. Microbiol Rev, 1987. 51(1): p. 88-134.
88. Ala'Aldeen D., K.H., *Staphylococcus aureus; molecular and clinical aspects*. Horwood Publishing; Chichester, UK, 2004: p. 237-58.

89. Ng E.Y., Trucksis M., Hooper D.C., *Quinolone resistance mediated by norA: physiologic characterization and relationship to flqB, a quinolone resistance locus on the Staphylococcus aureus chromosome*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. 38(6): p. 1345-55.
90. Witte W. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006*. J Antimicrob Chemother, 2007. 60(6): p. 1258-63.
91. Castanheira M. et al., *Occurrence and molecular characterization of fusidic acid resistance mechanisms among Staphylococcus spp. from European countries (2008)*. J Antimicrob Chemother, 2010. 65(7): p. 1353-8.
92. Berg Jeremy M., J.L.T., Stryer Lubert *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2007: p. 1224.
93. Murchan S. et al., *Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains*. J Clin Microbiol, 2003. 41(4): p. 1574-85.
94. Tenover F.C. et al., *Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 1994. 32(2): p. 407-15.
95. Bosch T. et al., *PFGE diversity within the methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonal lineage ST398*. BMC Microbiol, 2010. 10(1): p. 40.
96. Enright M.C. et al., *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2000. 38(3): p. 1008-15.
97. Feil E.J. et al., *eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data*. J Bacteriol, 2004. 186(5): p. 1518-30.
98. Deurenberg R.H., Stobberingh E.E., *The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Curr Mol Med, 2009. 9(2): p. 100-15.
99. Malachowa N. et al., *Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of Staphylococcus aureus isolates*. J Clin Microbiol, 2005. 43(7): p. 3095-100.
100. Robinson D.A., Enright M.C., *Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect, 2004. 10(2)
101. Harmsen D. et al., *Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management*. J Clin Microbiol, 2003. 41(12): p. 5442-8.
102. Ito T. et al., *Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(5): p. 1323-36.
103. Chongtrakool P. et al., *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(3): p. 1001-12.
104. Ma X.X. et al., *Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(4): p. 1147-52.
105. Ito T. et al., *Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. 48(7): p. 2637-51.
106. Oliveira D.C., Milheirico C., de Lencastre H., *Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(10): p. 3457-9.

107. Berglund C. et al., *Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec in a methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain isolated in Sweden*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. 52(10): p. 3512-6.
108. Zhang K. et al., *Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(2): p. 531-40.
109. Oefner PJ, U.P., *Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)*. Am J Hum Genet. , 1995. 57:: p. 266.
110. Nubel U. et al., *Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(37): p. 14130-5.
111. Knoop V., *Gene und Stammbäume*. 2009. 2. Auflage: p. 386.
112. *The International HapMap Project*. Nature, 2003. 426(6968): p. 789-96.
113. Fitzgerald J.R. et al., *Evolutionary genomics of Staphylococcus aureus: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(15): p. 8821-6.
114. Robinson DA, M.E., *Evolution of Staphylococcus aureus by large chromosomal replacements*. J Bacteriol, 2004. 186:: p. 1060-1064.
115. Robinson, D.A., Enright M.C., *Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. 47(12): p. 3926-34.
116. Tiemersma E.W. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999-2002*. Emerg Infect Dis, 2004. 10(9): p. 1627-34.
117. Ghebremedhin, B., et al., *Subtyping of ST22-MRSA-IV (Barnim epidemic MRSA strain) at a university clinic in Germany from 2002 to 2005*. J Med Microbiol, 2007. 56(Pt 3): p. 365-75.
118. Vandenesch F. et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence*. Emerg Infect Dis, 2003. 9(8): p. 978-84.
119. Otter J.A., French G.L., *Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe*. Lancet Infect Dis, 2010. 10(4): p. 227-39.
120. Chambers, H.F., *Community-associated MRSA--resistance and virulence converge*. N Engl J Med, 2005. 352(14): p. 1485-7.
121. David M.Z. et al., *Predominance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among pathogens causing skin and soft tissue infections in a large urban jail: risk factors and recurrence rates*. J Clin Microbiol, 2008. 46(10): p. 3222-7.
122. Wieler L.H., *MRSA – Ein Problem keineswegs nur der Humanmedizin! Bericht und kritische Anmerkungen zur FVE-Conference on Methicillinresistant Staphylococcus aureus*. Deutsches Tierärzteblatt, Juli 2008. 56. Jg.: p. 900-903.
123. Ferber D., *Infectious disease. From pigs to people: the emergence of a new superbug*. Science, 2010. 329(5995): p. 1010-1.
124. Yasuda R. et al., *Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from healthy horses in Japan*. Am J Vet Res, 2000. 61(11): p. 1451-5.
125. Weese J.S. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in horses and horse personnel, 2000-2002*. Emerg Infect Dis, 2005. 11(3): p. 430-5.
126. Walther B. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in veterinary medicine: a "new emerging pathogen"* Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2006. 119(5-6): p. 222-32.
127. Moodley A. et al., *spa typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland*. J Antimicrob Chemother, 2006. 58(6): p. 1118-23.
128. Van den Eede A. et al., *High occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in equine nasal samples*. Vet Microbiol, 2009. 133(1-2): p. 138-44.

129. Lin Y. et al., *Evidence of Multiple Virulence Subtypes in Nosocomial and Community-Associated MRSA Genotypes in Companion Animals from the Upper Midwestern and Northeastern United States*. Clin Med Res, 2010: p. 7-16.
130. Gomez-Sanz E. et al., *First Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus ST398 and Staphylococcus pseudintermedius ST68 from Hospitalized Equines in Spain*. Zoonoses Public Health, 2013: p. 192-201.
131. Vincze S. et al., *Alarming Proportions of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Wound Samples from Companion Animals, Germany 2010-2012*. PLoS One, 2014. 9(1): p. e85656.
132. Bergstrom K. et al., *Infection prevention and control interventions in the first outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in an equine hospital in Sweden*. Acta Vet Scand, 2012. 54: p. 14.
133. Van den Eede A. et al., *MRSA carriage in the equine community: an investigation of horse-care taker couples*. Vet Microbiol, 2013. 163(3-4): p. 313-8.
134. Loncaric I. et al., *Identification and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from Austrian companion animals and horses*. Vet Microbiol, 2014. 168(2-4): p. 381-7.
135. Abdelbary M.M. et al., *Phylogenetic Analysis of Staphylococcus aureus CC398 Reveals a Sub-Lineage Epidemiologically Associated with Infections in Horses*. PLoS One, 2014. 9(2): p. e88083.
136. van Duijkeren E. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs with exudative dermatitis*. Emerg Infect Dis, 2007. 13(9): p. 1408-10.
137. Pomba C. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 isolates with indistinguishable Apal restriction patterns in colonized and infected pigs and humans*. J Antimicrob Chemother, 2010: p. 193-4.
138. Wagenaar J.A. et al., *Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China*. Vet Microbiol, 2009. 139(3-4): p. 405-9.
139. Pomba C. et al., *First description of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) CC30 and CC398 from swine in Portugal*. Int J Antimicrob Agents, 2009. 34(2): p. 193-4.
140. Tenhagen B.A. et al., *Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs*. Vet Rec, 2009. 165(20): p. 589-93.
141. Khanna T. et al., *Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers*. Vet Microbiol, 2008. 128(3-4): p. 298-303.
142. Sergio D.M. et al., *Investigation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs used for research*. J Med Microbiol, 2007. 56(Pt 8): p. 1107-9.
143. Guardabassi L., Stegger M., Skov R., *Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus ST398 in Danish slaughter pigs*. Vet Microbiol, 2007. 122(3-4): p. 384-6.
144. Denis O. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in swine farm personnel, Belgium*. Emerg Infect Dis, 2009. 15(7): p. 1098-101.
145. Cui S. et al., *Isolation and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from swine and workers in China*. J Antimicrob Chemother, 2009. 64(4): p. 680-3.
146. Smith T.C. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers*. PLoS One, 2009. 4(1): p. e4258.
147. Kock R. et al., *Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009. 28(11): p. 1375-82.
148. Neela V. et al., *Prevalence of ST9 methicillin-resistant Staphylococcus aureus among pigs and pig handlers in Malaysia*. J Clin Microbiol, 2009. 47(12): p. 4138-40.
149. Guardabassi L. et al., *Novel lineage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Hong Kong*. Emerg Infect Dis, 2009. 15(12): p. 1998-2000.

150. Velebit B. et al., *MRSA in pigs in Serbia*. *Vet Rec*, 2010. 167(5): p. 183-4.
151. Gomez-Sanz E. et al., *Detection, Molecular Characterization, and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus CC398 and CC97 in Spanish Slaughter Pigs of Different Age Groups*. *Foodborne Pathog Dis*, 2010: p. 1269-77.
152. Battisti A. et al., *Heterogeneity among methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Italian pig finishing holdings*. *Vet Microbiol*, 2010. 142(3-4): p. 361-6.
153. Baba K. et al., *Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from swine in Japan*. *Int J Antimicrob Agents*, 2010: p. 352-4.
154. Arriola C.S. et al., *Presence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs in Peru*. *PLoS One*, 2011. 6(12): p. e28529.
155. Molla B. et al., *Epidemiology and genotypic characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains of porcine origin*. *J Clin Microbiol*, 2012. 50(11): p. 3687-93.
156. Asai T. et al., *Presence of Staphylococcus aureus ST398 and ST9 in Swine in Japan*. *Jpn J Infect Dis*, 2012. 65(6): p. 551-2.
157. Wan M.T., Lauderdale T.L., Chou C.C., *Characteristics and virulence factors of livestock associated ST9 methicillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel recombinant staphylocoagulase type*. *Vet Microbiol*, 2013. 162(2-4): p. 779-84.
158. Gibbons J.F. et al., *Investigation of the persistence and transmission of MRSA CC 5 in pigs following intra-nasal inoculation*. *Vet Microbiol*, 2013. 162(2-4): p. 771-8.
159. Crombe F. et al., *Transmission Dynamics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Pigs*. *Front Microbiol*, 2013. 4: p. 57.
160. Vandendriessche S. et al., *Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carried by humans and animals across livestock production sectors*. *J Antimicrob Chemother*, 2013. 68(7): p. 1510-6.
161. Ruzauskas M. et al., *First report of swine-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in Lithuania*. *Pol J Vet Sci*, 2013. 16(1): p. 125-7.
162. Smith T.C. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA*. *PLoS One*, 2013. 8(5): p. e63704.
163. Devriese L.A., Hommez J., *Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dairy herds*. *Res Vet Sci*, 1975. 19(1): p. 23-7.
164. Lee J.H., *Methicillin (Oxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans*. *Appl Environ Microbiol*, 2003. 69(11): p. 6489-94.
165. Juhasz-Kaszanyitzky E. et al., *MRSA transmission between cows and humans*. *Emerg Infect Dis*, 2007. 13(4): p. 630-2.
166. Kozytska S. et al., *Identification of specific genes in Staphylococcus aureus strains associated with bovine mastitis*. *Vet Microbiol*, 2010: p. 360-5.
167. Vanderhaeghen W. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows*. *Vet Microbiol*, 2010.
168. Graveland H. et al., *Methicillin resistant Staphylococcus aureus ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene*. *PLoS One*, 2010. 5(6): p. e10990.
169. Monecke S. et al., *Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of Staphylococcus aureus isolates from cattle*. *Vet Microbiol*, 2007. 125(1-2): p. 128-40.
170. Spohr M. et al., *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Three Dairy Herds in Southwest Germany*. *Zoonoses Public Health*, 2010: p. 252-61.
171. Haran K.P. et al., *Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus, including methicillin-resistant Staphylococcus aureus, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms*. *J Clin Microbiol*, 2012. 50(3): p. 688-95.
172. Paterson G.K. et al., *First detection of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 in bulk tank milk in the United Kingdom, January to July 2012*. *Euro Surveill*, 2012. 17(50).

173. Verheghe M. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 in pig farms and multispecies farms*. Zoonoses Public Health, 2013. 60(5): p. 366-74.
174. Smith E.M. et al., *Global distribution and diversity of ovine-associated Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol, 2013: p. 208-15.
175. Gindonis V. et al., *Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland*. Acta Vet Scand, 2013. 55: p. 61.
176. Lowder B.V. et al., *Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(46): p. 19545-50.
177. Bystron J. et al., *Genotypes and enterotoxin gene content of S. aureus isolates from poultry*. Vet Microbiol, 2010: p. 498-501.
178. Persoons D. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in poultry*. Emerg Infect Dis, 2009. 15(3): p. 452-3.
179. Pletinckx L.J. et al., *Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant Staphylococcus aureus: sampling methodology and within herd prevalence in broiler flocks and pigs*. Infect Genet Evol, 2011. 11(8): p. 2133-7.
180. Monecke S. et al., *Genotyping of Staphylococcus aureus isolates from diseased poultry*. Vet Microbiol, 2013. 162(2-4): p. 806-12.
181. Argudin M.A. et al., *Genotyping and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolates from diseased turkeys*. Avian Pathol, 2013. 42(6): p. 572-80.
182. Wendlandt S. et al., *Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates on broiler farms*. Vet Microbiol, 2013. 167(3-4): p. 632-7.
183. O'Mahony R. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland*. Vet Microbiol, 2005. 109(3-4): p. 285-96.
184. Boost M.V. O'Donoghue M.M., Siu K.H., *Characterisation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from dogs and their owners*. Clin Microbiol Infect, 2007. 13(7): p. 731-3.
185. Manian F.A., *Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts*. Clin Infect Dis, 2003. 36(2): p. 26-8.
186. Sing A., Tuschak C., Hormansdorfer S., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a family and its pet cat*. N Engl J Med, 2008. 358(11): p. 1200-1.
187. Walther B. et al., *Staphylococcus aureus and MRSA colonization rates among personnel and dogs in a small animal hospital: association with nosocomial infections*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2009. 122(5-6): p. 178-85.
188. Leonard F.C. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from a veterinary surgeon and five dogs in one practice*. Vet Rec, 2006. 158(5): p. 155-9.
189. van Duijkeren E. et al., *[Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection in a dog in the Netherlands]*. Tijdschr Diergeneeskd, 2003. 128(10): p. 314-5.
190. Abbott Y., Leonard F.C., Markey B.K., *Detection of three distinct genetic lineages in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates from animals and veterinary personnel*. Epidemiol Infect, 2010. 138(5): p. 764-71.
191. Rankin S. et al., *Panton valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals*. Vet Microbiol, 2005. 108(1-2): p. 145-8.
192. Floras A. et al., *Sequence type 398 methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection and colonisation in dogs*. Vet Rec, 2010. 166(26): p. 826-7.
193. Haenni M. et al., *A USA300 variant and other human-related methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains infecting cats and dogs in France*. J Antimicrob Chemother, 2012. 67(2): p. 326-9.
194. Zhang W. et al., *Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from pet animals and veterinary staff in China*. Vet J, 2011. 190(2): p. e125-9.
195. Aklilu E. et al., *Molecular relatedness of methicillin-resistant S. aureus isolates from staff, environment and pets at University Veterinary Hospital in Malaysia*. PLoS One, 2012. 7(8): p. e43329.

196. Quitoco I.M. et al., *First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (ST71)*. BMC Res Notes, 2013. 6: p. 336.
197. Loeffler A. et al., *Whole-genome comparison of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC22 SCCmecIV from people and their in-contact pets*. Vet Dermatol, 2013. 24(5): p. 538-e128.
198. Reischl U. et al., *Single-nucleotide polymorphism in the SCCmec-orfX junction distinguishes between livestock-associated MRSA CC398 and human epidemic MRSA strains*. Euro Surveill, 2009. 14(49): p. 49, Artikel 6.
199. van de Giessen A.W. et al., *Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in rats living on pig farms*. Prev Vet Med, 2009. 91(2-4): p. 270-3.
200. Faires, M.C., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in marine mammals*. Emerg Infect Dis, 2009. 15(12): p. 2071-2.
201. van Belkum A., et al. *Methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus sequence type 398 in pigs and humans*. Emerg Infect Dis, 2008. 14(3): p. 479-83.
202. van Wamel W.J. et al., *Short term micro-evolution and PCR-detection of methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus sequence type 398*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. 29(1): p. 119-22.
203. Stull J.W. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a neonatal alpaca*. Can Vet J, 2012. 53(6): p. 670-2.
204. Wardyn S.E., Kauffman L.K., Smith T.C., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in central Iowa wildlife*. J Wildl Dis, 2012. 48(4): p. 1069-73.
205. Milheirico C., Oliveira D.C., de Lencastre H., *Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: 'SCCmec IV multiplex'*. J Antimicrob Chemother, 2007. 60(1): p. 42-8.
206. Wulf M. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in veterinary doctors and students, the Netherlands*. Emerg Infect Dis, 2006. 12(12): p. 1939-41.
207. van Loo I. et al., *Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus of animal origin in humans*. Emerg Infect Dis, 2007. 13(12): p. 1834-9.
208. de Boer E. et al., *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat*. Int J Food Microbiol, 2009. 134(1-2): p. 52-6.
209. Huijsdens X.W. et al., *Community-acquired MRSA and pig-farming*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2006. 5: p. 26.
210. Krziwanek K., Metz-Gercek S., Mittermayer H., *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus ST398 from human patients, upper Austria*. Emerg Infect Dis, 2009. 15(5): p. 766-9.
211. Wulf M.W. et al., *MRSA carriage in healthcare personnel in contact with farm animals*. J Hosp Infect, 2008. 70(2): p. 186-90.
212. Robert-Koch-Institut, *Kommentar zu den „Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von MRSA-Stämmen in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen“*. Epidemiologisches Bulletin 2008. Nr. 42: p. 363-364.
213. Hartmeyer G.N. et al., *Pig-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Family transmission and severe pneumonia in a newborn*. Scand J Infect Dis, 2010.
214. Yu F. et al., *Prevalence of Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China*. Clin Microbiol Infect, 2008. 14(4): p. 381-4.
215. Welinder-Olsson C. et al., *Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus t034*. Emerg Infect Dis, 2008. 14(8): p. 1271-2.
216. Pan A. et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 infection, Italy*. Emerg Infect Dis, 2009. 15(5): p. 845-7.
217. Soavi L. et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398, Italy*. Emerg Infect Dis, 2010. 16(2): p. 346-8.

218. Salmenlinna S. et al., *Human cases of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398, Finland*. Emerg Infect Dis, 2010. 16(10): p. 1626-9.
219. Omland O., Hoffmann L., *Occupational acquisition of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in humans--a description of MRSA carrier and infected cases from the Region of North Jutland in Denmark*. Ann Agric Environ Med, 2012. 19(4): p. 637-40.
220. Senneville E. et al., *First report of the predominance of clonal complex 398 Staphylococcus aureus strains in osteomyelitis complicating diabetic foot ulcers: a national French study*. Clin Microbiol Infect, 2013.
221. Chlebowicz M.A. et al., *Recombination between ccrC genes in a type V (5C2&5) staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) of Staphylococcus aureus ST398 leads to conversion from methicillin resistance to methicillin susceptibility in vivo*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. 54(2): p. 783-91.
222. Price L.B. et al., *Staphylococcus aureus CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock*. MBio, 2012. 3(1).
223. Uhlemann A.C. et al., *Identification of a highly transmissible animal-independent Staphylococcus aureus ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties*. MBio, 2012. 3(2).
224. Cookson B.D. et al., *Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains: the HARMONY collection*. J Clin Microbiol, 2007. 45(6): p. 1830-7.
225. Tenover F.C. et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. J Clin Microbiol, 1995. 33(9): p. 2233-9.
226. Oliveira D.C., Milheirico C., de Lencastre H., *Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(10): p. 3457-9.
227. Huletsky A. et al., *New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from specimens containing a mixture of staphylococci*. J Clin Microbiol, 2004. 42(5): p. 1875-84.
228. Noto M.J. P.M. Fox, and G.L. Archer, *Spontaneous deletion of the methicillin resistance determinant, mecA, partially compensates for the fitness cost associated with high-level vancomycin resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. 52(4): p. 1221-9.
229. Mullis K. et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. 51 Pt 1: p. 263-73.
230. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
231. Drummond A.J., Rambaut A., *BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*. BMC Evol Biol, 2007. 7: p. 214.
232. Zuckerkandl, E., Pauling L., *Molecules as documents of evolutionary history*. J Theor Biol, 1965. 8(2): p. 357-66.
233. Schijffelen M.J. et al., *Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 isolate from a case of human endocarditis*. BMC Genomics, 2010. 11: p. 376.
234. Kondo R. et al., *Evolution of hominoid mitochondrial DNA with special reference to the silent substitution rate over the genome*. J Mol Evol, 1993. 36(6): p. 517-31.
235. Nei M., Miller J.C., *A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data*. Genetics, 1990. 125(4): p. 873-9.
236. Nei M., *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Univ. Press. New York., 1987.
237. Rozas J. et al., *DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods*. Bioinformatics, 2003. 19(18): p. 2496-7.
238. Kryazhimskiy S., Plotkin J.B., *The population genetics of dN/dS*. PLoS Genet, 2008. 4(12): p. e1000304.

239. Nubel U. et al., *A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. PLoS Pathog, 2010. 6(4): p. e1000855.
240. Achtman M. et al., *Microevolution and history of the plague bacillus, Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(51): p. 17837-42.
241. Pearson T. et al., *Phylogenetic discovery bias in Bacillus anthracis using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(37): p. 13536-41.
242. Roumagnac P. et al., *Evolutionary history of Salmonella typhi*. Science, 2006. 314(5803): p. 1301-4.
243. Kurt K. et al., *Subpopulations of Staphylococcus aureus clonal complex 121 are associated with distinct clinical entities*. PLoS One, 2013. 8(3): p. e58155.
244. Dordel J., *Untersuchungen zur Mikroevolution von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus im klonalen Komplex CC5*. Dissertation, 2012: p. 123.
245. Geenen P.L. et al., *Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms*. Epidemiol Infect, 2012: p. 1-10.
246. Jansen M.D., Box A.T., Fluit A.C., *SCCmec typing in methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains of animal origin*. Emerg Infect Dis, 2009. 15(1): p. 136-7; author reply 136-7.
247. Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K., *A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. 44(6): p. 1549-55.
248. Blaha T., *Wie „emerging“ ist das Vorkommen von MRSA ST398 beim Schwein?* Deutsches Tierärzteblatt, 2008. 56(7): p. S. 904-905.
249. Gottschalk G., *Welt der Bakterien: die unsichtbaren Beherrscher unseres Planeten*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. 1: p. 274.
250. Meemken D. et al., *[Occurrence of MRSA in pigs and in humans involved in pig production--preliminary results of a study in the northwest of Germany]*. Dtsch Tierärztl Wochenschr, 2008. 115(4): p. 132-9.
251. Nathaus R. et al., *[Investigations into the use of respiratory masks for reducing the MRSA-exposure of veterinarians visiting regularly pig herds--first experiences]*. Berl Munch Tierärztl Wochenschr, 2011. 124(3-4): p. 128-35.
252. Heine U., *Vergleichende Querschnittsuntersuchungen zum Vorkommen von MRSA (Methicillin-resistente Staphylococcus aureus) in ökologisch wirtschaftenden Schweinebetrieben in Deutschland*. Tagungsbandes der 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Verlag Dr. Köster, Berlin, 2011: p. S. 108-111.
253. Espinosa-Gongora C. et al., *Transmission of MRSA CC398 strains between pig farms related by trade of animals*. Vet Rec, 2012. 170(22): p. 564.
254. van Duijkeren E. et al., *Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains between different kinds of pig farms*. Vet Microbiol, 2008. 126(4): p. 383-9.
255. Broens E.M. et al., *Prevalence and risk factor analysis of livestock associated MRSA-positive pig herds in The Netherlands*. Prev Vet Med, 2011. 102(1): p. 41-9.
256. Cuny C., Friedrich A.W., Witte W., *Absence of livestock-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus clonal complex CC398 as a nasal colonizer of pigs raised in an alternative system*. Appl Environ Microbiol, 2012. 78(4): p. 1296-7.
257. Moodley A., Nielsen S.S., Guardabassi L., *Effects of tetracycline and zinc on selection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) sequence type 398 in pigs*. Vet Microbiol, 2011. 152(3-4): p. 420-3.

## 10. Anhang

Tab. 21: Auflistung der einzelnen Primer für alle untersuchten Loci

Locus	ORF	Annotation	Genkategorie*	Primer 1	Primer 2	Position 1	Position 2	Produkt-Größe nm	dHPLC Temperatur
au200	SA0016	adenylosuccinate synthase	housekeeping (II)	TTCGTTTCGAAGGTAATTGG	CGTGCATTTTCAGGTAATTCTT	23216	23628	413	56,3
au201	SA0098	aminoacylase	housekeeping (II)	TGAAGATGAAACGGCGAAAT	CCTGTTTTTCATTGTGCTCAT	110529	110948	420	57,3
au202	SA0113	ornithine cyclodeaminase	housekeeping (II)	AAACGCGTGTTTGTTCGCA	TTTTGTTGTTGTGCCTGTTGA	130244	130731	488	56,3
au203	SA0123	UDP-glucose 4-epimerase	housekeeping (II)	TGGTTTTATTGGGTGCGATT	AATTTAATGTCGTCCGTTCCG	142173	142618	446	54,7
au204	SA0171	NAD-dependent formate dehydrogenase	housekeeping (II)	TGCGCATGAATTACAACACA	TCTTCAATGCGTTTTTGTGC	194535	195002	468	55,4
au205	SA0182	indole-3-pyruvate decarboxylase	housekeeping (II)	TTAGTTGCAATGAGCCATCA	TTCAGCAACAGCAGGATTTT	213236	213690	455	54,3
au206	SA0202	gamma-glutamyltranspeptidase precursor	housekeeping (II)	TCTTGCGGCTAAAATTGGTAA	TGGCGCGAATATTTTTTCAGT	239439	239855	417	56,3
au207	SA0220	glycerophosphodiester phosphodiesterase	housekeeping (II)	TGAAAAGCGCATTGTTCTTC	TCCATTTTGACGCATTTTCA	263008	263471	464	54,6
au208	SA0256	6-phospho-beta-glucosidase	housekeeping (II)	CCGCAAATCAATTTGAAGGT	GCGCAAATGCACAAAATAA	310060	310488	429	55,6
au209	SA0299	carbohydrate kinase, PfkB family	housekeeping (II)	TTGCAGAAACATCAAATCCTG	TCATTTTTGGGGAAGAAACC	355123	355563	441	56
au210	SA0311	trimethylamine dehydrogenase	housekeeping (II)	TCGAAATTTCCACACCATCA	CCGTAAACGCATCAACAAAA	369364	369789	426	57,7
au212	SA0346	cystathionine beta-lyase	housekeeping (II)	TGACAGCACCAGCAATTA	ATTCGCTTTTGCTTTTGCA	405743	406170	428	56,2
au213	SA0376	GMP synthase	housekeeping (II)	AAGTTGAACGTGCCAATGAA	TTGATCCCCAATTGCTTTATG	434800	435239	440	57,2
au214	SA0419	cystathionine gamma-synthase	housekeeping (II)	CAAACATGGCTTTGCGTTTA	ATGCCACCTGTTGAATTTGA	480802	481293	492	56,5
au215	SA0431	NADH-glutamate synthase small subunit	housekeeping (II)	AAGCGGGCATTACTTTCATT	AACGCATTGTTTGAACACCA	495821	496294	474	55,8
au218	SA0507	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	housekeeping (II)	TCAAATTTGGGATTATGGTGTG	CAAACCTCATGAAACCATTGA	592338	592835	498	54,9
au219	SA0512	branched-chain amino acid aminotransferase	housekeeping (II)	AAATTTACCTGCTGCACAA	TGCAACTTTTGCAAAGCCTA	599411	599841	431	56,6
au220	SA0537	phosphomethylpyrimidine kinase	housekeeping (II)	AAGCTTTGCCACCTTTAATGA	TGCAAGCAGATTGAAAACG	631634	632116	483	56,3
au222	SA0697	glycerate kinase	housekeeping (II)	CAGTTGCAAGCCAAATTGAA	TCGACTTGAAAAATCCGACA	795048	795547	500	55,6
au223	SA0730	phosphoglycerate mutase	housekeeping (II)	CGGAAATTTTTGCGAACAGA	TTCGATTGCTTTGATTGTCG	836703	837148	446	55,3
au224	SA0791	glycerate dehydrogenase	housekeeping (II)	TGACGTTGTTATGTGGCAAAA	TTAAACCCTTGCAACCTTCTT	896974	897414	441	56,8
au225	SA0859	thimet oligopeptide component of pyruvate	housekeeping (II)	TACTGAATTGCGCAAAGAATTG	ATGCAACTTCAGCGACAAAA	974341	974741	401	55,4
au226	SA0945	dehydrogenase	housekeeping (II)	AAAGAAATCGCAGCTGAACAA	TTTTGAGCAATACGGCCAAT	1073758	1074161	404	56,2
au227	SA1044	dihydroorotase	housekeeping (II)	ATGAAGGGAAACGCAGTAAA	CAATTCGAATGGTGCTTTT	1181330	1181731	402	56,4

Locus	ORF	Annotation	Genkategorie*	Primer 1	Primer 2	Position 1	Position 2	Produkt-Größe nm	dHPLC Temperatur
au228	SA1115	ribC, riboflavin kinase / FAD synthase	housekeeping (II)	CAATGGCATTTCGGATTTTTTC	CATTCGCTTTTTGCAACTCA	1264780	1265262	483	53,8
au229	SA1177	transketolase	housekeeping (II)	TTGGTTACCCGAATAAAGCA	TGGATTTGTTTGAACCAGCA	1339372	1339785	414	54,8
au230	SA1226	aspartate semialdehyde dehydrogenase (ASD)	housekeeping (II)	AAAAAGCTGGTGCAATCGTT	TCGTTTCTTTGTCAAGCGTTA	1401265	1401747	483	56,1
au231	SA1308	30S ribosomal protein S1 oxygen-independent	housekeeping (II)	ATGCACCAAAGTTTGCCAAT	TTCCGGCTTCACTAATTTCAA	1513993	1514478	486	54,8
au232	SA1412	coproporphyrinogen oxidase III	housekeeping (II)	TTCATGGCCATCTAATGCAA	CATTTGAAGCAAATCCTGATGA	1617553	1618016	464	54,6
au233	SA1496	glutamyl-tRNA reductase	housekeeping (II)	ATTTCCCTGCACCAATAAT	CGAATTGCCCATGAAGATTT	1704604	1705096	493	56,1
au234	SA1545	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	housekeeping (II)	TGCAGTGAATGCACCTAAAA	TAACAATGCGCCAGTTTTTC	1766721	1767216	496	54,2
au235	SA1681	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	housekeeping (II)	TTCAAGAACAAGCAGCCAAA	TGAGGCATTACCATTCCAAA	1926891	1927314	424	56
au236	SA1814	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	housekeeping (II)	ATGTTGCACCCATGTTCAAA	CATCGATTTGATGTGCCATT	2053853	2054311	459	55,6
au237	SA1924	aldehyde dehydrogenase	housekeeping (II)	GCAATGCTGCTGCTAATTTT	TTAATGGCGAATGGGTAGAAA	2173216	2173675	460	56,7
au238	SA1991	6-phospho-beta-galactosidase	housekeeping (II)	TTTTGTTGGCAATGCGTGTA	ATTTCAATTGCATGGTCACG	2263407	2263853	447	55,1
au239	SA2120	amino acid amidohydrolase	housekeeping (II)	GCAATTGCTTTATGCGTCAAT	TCAAACAGGGGCAATTACA	2383969	2384377	409	57,3
au240	SA2214	bioA, aminotransferase anaerobic	housekeeping (II)	ACCCTGCGATTTTCATCATT	TAAAATTGCCATTCTACGC	2485384	2485811	428	55,7
au242	SA2410	ribonucleoside-triphosphate reductase	housekeeping (II)	ACTCGTGCGCAAATTTCTTT	ACGGATCGTTTTGTGCGTTT	2701426	2701886	461	56,5
au243	SA2470	histidinol dehydrogenase	housekeeping (II)	TGTTTGAATCGACGCATGTT	TTGCTGCATTGACTTATGGAA	2781905	2782326	422	57,2
au244	SA0177	argJ, arginine biosynthesis bifunctional protein	housekeeping (II)	TGGCAAATCACCAAGTTGAA	TGCGTTAATACGCACATAATCA	207388	206898	491	57,0
au245	SA0240	sorbitol dehydrogenase	housekeeping (II)	TTGAAAGTGCGAATGACGTT	CAAATATTCGTGCCCATGGA	291411	291896	486	57,9
au247	SA0361	phosphoglycerate mutase	housekeeping (II)	CATGGCGAATCAAAATCGAA	CCATCAAACAACGAATGACAA	418661	419144	484	55,2
au248	SA0527	glucosamine-6-phosphate isomerase	housekeeping (II)	AAGAGATGGCATTAAATCAGCA	AATGGCTTGCTTTGGAACAT	622181	622659	479	54,6
au250	SA0572	esterase/lipase	housekeeping (II)	TTTAAACGATCACGTTGAGGA	AAAGGATCATGTTCCCCATT	665507	665947	441	54,2
au251	SA0671	urea amidolyase	housekeeping (II)	GAAATTGTGCCATCAGAATCA	TTTAAGCGTGCGAAATCTGA	764197	764696	500	54,2
au252	SA0821	argH, argininosuccinate lyase	housekeeping (II)	TGCATTTTCAACTGGCTCAT	TTTGACGTGCTTTCAAGCAA	926505	926012	494	54,8
au253	SA0896	menD, menaquinone biosynthesis protein	housekeeping (II)	GGTTAGAAAAATGGCAATGCT	GCCAAACAACCGTTCAAAAT	1017529	1017968	440	54,1
au254	SA0924	purN, phosphoribosylglycinamide formyltransferase	housekeeping (II)	CGATTTTTGCATCAGGTTCA	TTTTGAATCGTCCGGTCTAA	1049523	1050001	479	54,8
au255	SA1089	sucD, succinyl-CoA synthetase	housekeeping (II)	AAAAATGAAACTGGGGCAAC	CCGATTTACCAATCATAACAA	1232627	1233078	452	56,9
au256	SA1150	glnA, glutamine-ammonia ligase	housekeeping (II)	TGAAAAAGGGGAACCAACTT	AATCCGCGTGATTTTTAAG	1307593	1308024	432	56,1
au257	SA1366	glycine dehydrogenase subunit 1	housekeeping (II)	TCGCATTGCAAGCAAGAATA	CAATTGAACCGTAAAAGTTTGG	1575507	1575017	491	55,6

Locus	ORF	Annotation	Genkategorie*	Primer 1	Primer 2	Position 1	Position 2	Produkt-Größe nm	dHPLC Temperatur
au258	SA1487	folC, folic acid synthase	housekeeping (II)	TTTACGTCGCCGTTTATTGA	CAATTGGCTTTGCATGTTGT	1693720	1693267	454	55,8
au259	SA1524	malate dehydrogenase homolog	housekeeping (II)	CGCAATTTTTGAAGGACGTT	CTTTAGCAACATTACGAGCAA	1739845	1739355	491	56,2
au260	SA1554	acsA, acetyl-CoA synthetase	housekeeping (II)	ATTGTTGGGCCGTTATTTGA	TTTGTAGCGCCATTTAACCA	1781729	1781281	449	55,8
au261	SA1585	proline dehydrogenase	housekeeping (II)	TTTAGGGGAATTTGTCGGTA	GAAATTGCGTGCGTTTAACA	1824023	1824497	475	54,7
au262	SA1669	citG, fumarate hydratase, class-II	housekeeping (II)	ACACATTTACAAGATGCAACG	TGCAACCATTGTTAACATTTCA	1906352	1905900	453	57,2
au263	SA1735	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	housekeeping (II)	CCTGAAATTGCCGTTTAAAT	TTTTTCGAGAAACAACACCAGA	1987761	1988244	484	55,1
au264	SA1864	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	housekeeping (II)	TGCATTTGGAATTGGAACAA	TGATTTCAAGGAATGGTTCA	2105510	2106003	494	56,1
au265	SA1965	glmM, phosphoglucosamine-mutase	housekeeping (II)	ACAAAGCGCTTGAACAAGAA	TTGTGCAAATCTTTCAGCATC	2226346	2225913	434	55,4
au267	SA2071	moeB, molybdopterin biosynthesis protein moeB	housekeeping (II)	TGCGTTGATTATTGGTATGG	TTTAATGCTGGCAATTGTGG	2332760	2332305	456	56,0
au268	SA2099	monooxygenase para-nitrobenzyl esterase chain A	housekeeping (II)	ATCCGGATTGTGCAAAGAA	TGGGCAATTTTACCGATTTT	2359332	2359800	469	54,7
au269	SA2240	glucose 1-dehydrogenase	housekeeping (II)	TGCACGCAATAAAGCACAAAT	TGCAAATTCAGCAAGCCATA	2517061	2517511	451	55,0
au270	SA2260	pyruvate oxidase	housekeeping (II)	TGCGTGGGACAATTTTAAATG	TTCCACGAATCATCACTTAAC	2538172	2537713	460	57,6
au271	SA2327	crtN, squalene desaturase	housekeeping (II)	ATGTACGATGCCAAAATGGA	TCATCCGGCAAGATTGTTTT	2613400	2612925	476	54,9
au272	SA2348	2-dehydropantoate 2-reductase	housekeeping (II)	TTAATGCCAGATTTTGCACCT	TTTCGCATGATACGTTTGCT	2638864	2638403	462	54,3
au273	SA2393	pckA, phosphoenolpyruvate carboxykinase	housekeeping (II)	AGACACGCCAAAACAATAACA	ATGCATGATTGCAACTGTCT	2680864	2681340	477	55,7
au274	SA2490	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	housekeeping (II)	TTTCAACTTTTCGACGACACAA	TGCTTTAAATGTGGTGCAGA	1844849	1845280	432	54,4
au275	SA0969	pyrroline-5-carboxylate reductase	housekeeping (II)	CGCACCACAAATTATGTTTGA	TTCGGGATTGTTTGTGTTGAA	1099873	1099466	408	55,6
au276	SA1334	hypothetical protein	hypothetical (V)	AACACGCATCAAACCACATA	TTTTTCTTAATTGAGCCATGC	1540736	1541178	443	55,7
au277	SA2439	hypothetical protein	hypothetical (VI)	AATGCCTCAACGCAACATTA	CAACGATTTGGCGATTTGAT	2743554	2743068	487	54,9
au278	SA1619	hypothetical protein	hypothetical (VI)	AAAAGCAAATGACACCACAAGA	TTGCATGGTTATCATGTTTTTC	1853647	1854096	450	54,9
au279	SA0740	hypothetical protein	hypothetical (VI)	TTGGAACATTTATTATGGCTTT	ACGGTCGATTTGACCTTTTA	847062	847504	443	54,0
au280	SA0817	NADH-dependent oxidoreductase	cell envelope (I)	TGAAGAAGTGCTTAAAGCGAAA	AATTTTCATCTTCCCGTCCAT	921075	921477	403	57,0
au281	SA2445	hypothetical protein	hypothetical (VI)	TTAAAATGGCCGGATGATGT	TTTCGCTGGAATATGATTGG	2753616	2753158	459	55,4
au282	SA2121	hutI, imidazolonepropionase	housekeeping (II)	CCCATTTAACATTTGGTGGA	GCTTCTTTGGCTTTTTGCAT	2386152	2385678	475	56,0
au284	SA0015	dnaC, replicative DNA helicase	information pathways (III)	AAAGTTGCAACGCATGAAGA	TTGCTCAATCGAACCAGATT	21445	21939	495	56,8
au285	SA0119	hypothetical protein, similar to diaminoimelate	housekeeping (II)	TTGAATGTGGGCGCTTTATT	TCCTCCTTTGTTGCGTTAAA	138812	139214	403	56,3

Locus	ORF	Annotation	Genkategorie*	Primer 1	Primer 2	Position 1	Position 2	Produkt-Größe nm	dHPLC Temperatur
au286	SA0223	hypothetical protein, similar to UDP-glucose 4-epimerase	housekeeping (II)	TGCAATCGTTTGAGAAGCAA	TGGTCGGTTCAAAGATGAAA	267449	267872	424	57,7
au287	SA0416	hypothetical protein, similar to carboxylesterase	housekeeping (II)	ATTAATAATTGGCGCAGCACT	GCATTGAAAAAGCGAATAACA	477346	477781	436	55.0
au288	SA0545	phosphotransacetylase	housekeeping (II)	GCGCAAAAACCTTGATCTTGA	TGCCAAAGCTTAATGCTGATT	638508	639919	412	56.4
au289	SA0656	probable N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	housekeeping (II)	ATTGTTGCAATTGGAGAAGG	ACGTTTCAAGCGCTTCTTTT	750368	750863	495	54.9
au290	SA0843	3-oxoacyl- synthase	housekeeping (II)	TATGGCAATTGCAGGTTTCA	TTGCTTCAATTCCACCTGTT	956696	957156	461	57.8
au291	SA0881	hypothetical protein, similar to nucleotidase	housekeeping (II)	GGCATCAAACGTTGGATTA	GCGAAAATGGATGTGTTTGA	1001452	1001936	485	54.6
au292	SA0902	HisC homolog	housekeeping (II)	TGGAACGATTGCTAAATGTGTT	TCCTTCGCTGAATTTGAAGA	1023317	1023721	405	54.8
au293	SA0958	myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase homolog	housekeeping (II)	TTTATGGATTTGCCCAAGGA	TTCAATGGTTTCAAGGGTTG	1084827	1085247	421	54.8
au294	SA1121	hypothetical protein, similar to processing proteinase	housekeeping (II)	AAGAAATGGCCAACCGATAA	TTGCCGACAACATAAACAGAA	1273973	1274433	461	53.2
au295	SA1163	aspartate kinase homolog	housekeeping (II)	AACAAAAATACCCGCTTCCTT	AAAGTTTCCAATTCGGTGGT	1324852	1325298	447	53.9
au296	SA1199	hypothetical protein, similar to anthranilate synthase	housekeeping (II)	AAATCCAACCATTCATGCCTA	TTCGCTGCATTCTTTTGGAT	1373094	1373518	425	55.3
au297	SA1298	3-dehydroquinate synthase	housekeeping (II)	TTGCACTACAATATCGCCAAA	TGAATCAACGACGCAAGAAA	1504486	1504930	445	54.6
au298	SA1349	dihydrolypoamide dehydrogenase	housekeeping (II)	TTGATCCAACATGTGCCAAT	TGGTGTATCGGAATGGAAT	1559232	1559653	422	54.6
au299	SA1377	glucokinase	housekeeping (II)	TCAAATTGAGCAGGTGCAAA	GCGCAGAAATAGGTCATTTT	1582274	1582676	403	54.7
au300	SA1652	uroporphyrinogen decarboxylase	housekeeping (II)	AAGCAAACCATGTTGCTTCA	TTCGCAACCAGAATATCGAA	1886778	1887220	443	55.3
au301	SA1685	hypothetical protein, similar to A/G-specific adenine	housekeeping (II)	AATTGCCACATACCATGCAA	TCCCAAAGATCCTGATCAATTT	1932656	1933123	468	54.6
au302	SA1724	adenylosuccinate lyase	housekeeping (II)	ACGGAAAGGTGTTTTGCTTT	AAATTTGCCGTTGAAATTCG	1974092	1974559	468	55.6
au303	SA1749	hypothetical protein, similar to aspartate transaminase	housekeeping (II)	GCCCAAAGCTTAAATGAACAA	ATGTTTGAAGGTTTGCACCA	2001475	2001949	475	55.6
au304	SA1858	dihydroxy-acid dehydratase	housekeeping (II)	TTGGTTTGACGGCGTATTTT	ATGCATCATCAATTGCTTCG	2097921	2098372	452	57.5
au305	SA1874	alanine racemase	housekeeping (II)	TCGCATTGATGACCATTTACA	CTTGATTTTGAAGGCGTGTTT	2122432	2122892	461	55.8
au306	SA1963	mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	housekeeping (II)	TTGCAGACGTCAATGAAGAAA	TCTTTTTCAACAACCCATTTCG	2216805	2217249	445	55.2
au307	SA2001	hypothetical protein, similar to oxidoreductase	housekeeping (II)	TTCTTCTTGTGATGGAATGGA	AAACAGCAGAAGCGGTTAAA	2272199	2272623	425	55.1
au308	SA2140	hypothetical protein, similar to esterase	housekeeping (II)	TGCCATTAATTGGCGATATG	TTCCATTGGAGATTGTTGGA	2404832	2405246	415	55.8
au309	SA2188	nitrite reductase	housekeeping (II)	TGCATTTCCATCAACCATTC	TAACCGCATCATGCTTTCAA	2459852	2460274	423	55,7

Tab. 22: Multiplex PCR-Ansätze (Referenzstamm 08-00301)

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
1	08-00360	Deutschland
	08-00700	Deutschland
	08-01058	Deutschland
	08-01223	Deutschland
	08-01605	Deutschland
	08-02807	Deutschland
	08-02710	Deutschland
	07-00415	Deutschland
	07-01429	Deutschland
	07-01826	Deutschland

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
2	07-01274	Deutschland
	07-02632	Deutschland
	07-02642	Deutschland
	07-02415	Deutschland
	07-02431	Deutschland
	07-02464	Deutschland
	07-03443	Deutschland
	08-00401	Deutschland
	08-01737	Deutschland

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
3	07-01640	Deutschland
	07-02347	Deutschland
	06-02985	Österreich
	06-00262	Österreich
	08-00537	Deutschland
	05-02057	Deutschland
	09-00339	Belgien
	09-00340-1	Belgien
	09-00341	Belgien
	09-00342	Belgien
	09-00343	Belgien

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
4	06-03005	Deutschland
	06-03034	Deutschland
	07-01494	Deutschland
	07-01653	Deutschland
	07-02239	Deutschland
	07-02558	Deutschland
	07-03026	Deutschland
	08-01388	Deutschland
	08-02418	Deutschland

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
5	09-01308	USA
	09-01309	USA
	09-01310	USA
	09-01311	UK
	09-01312	USA
	09-01313	UK
	09-01314	UK
	09-01315	UK
	09-01316	USA
	09-01318	UK

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
6	09-02435	Niederlande
	09-02436	Niederlande
	09-02437	Niederlande
	09-02438	Niederlande
	09-02439	Niederlande
	09-02440	Niederlande
	09-02441	Niederlande
	09-02442	Niederlande
	09-02444	Niederlande

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
7	09-02427	Niederlande
	09-02428	Niederlande
	09-02429	Niederlande
	09-02431	Niederlande
	09-02432	Niederlande
	09-02434	Niederlande
	09-02476	Italien
	09-02477	Italien
	09-02478	Italien

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
8	06-02016	Österreich
	07-00755	Österreich
	07-00757	Österreich
	07-01337	Österreich
	07-01388	Österreich
	07-00471	Österreich
	07-00334	Österreich
	07-01335	Österreich
	07-01238	Österreich
	07-01239	Österreich
	07-01730	Österreich

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
9	08-00907	Deutschland
	08-02208	Deutschland
	08-00912	Deutschland
	09-00709	Deutschland
	09-00711	Deutschland
	09-02165	Deutschland
	09-02423	Deutschland
	09-02611	Deutschland
	09-02615	Deutschland
	08-01712	Deutschland
	09-00393	Deutschland
	08-01849	Deutschland

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
10	07-02424	Deutschland
	07-02432	Deutschland
	07-02433	Deutschland
	09-00443	Deutschland
	09-00444	Deutschland
	09-00445	Deutschland
	08-00306	Deutschland
	08-00307	Deutschland
	08-00308	Deutschland

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
11	08-00543	Deutschland
	08-00798	Deutschland
	08-00888	Deutschland

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
13	04-03094	Deutschland
	06-00880	Österreich
	06-00903	Deutschland

Multiplex- ansatz	Isolat	Land
12	09-03323	Deutschland
	09-03324	Deutschland
	09-03325-1	Deutschland
	09-03326	Deutschland
	09-03327	Deutschland

Tab. 23: Primer für molekulare Typisierungsmethoden

Primer für Typisie- rung	Sequenz (5'-3')	Ta (°C)	Tp (sec.)	Zyklen	Amplifikation (bp)
<b>spa-</b> <b>Typisie-</b> <b>ung:</b>					
<i>spa f</i>	TAA AGA CGA TCC TTC AGT GAG	60	30	30	200-600
<i>spa r</i>	CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT	60	30	30	
<b>MLST:</b>					
<i>arcCf</i>	TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC	50	30	35	570
<i>arcCr</i>	AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG				
<i>aroE f</i>	ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC	50	30	35	536
<i>aroE r</i>	GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC				
<i>glpFf</i>	CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C	50	30	35	576
<i>glpFr</i>	TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC				
<i>gmKf</i>	ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC	50	30	35	488
<i>gmKr</i>	TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA				
<i>ptaf</i>	GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG	50	30	35	575
<i>ptar</i>	GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA				
<i>tpif</i>	TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA	50	30	35	475
<i>tpi r</i>	TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC				
<i>ygiLf</i>	CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC	50	30	35	598
<i>ygiLr</i>	CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC				
<b>SCCmec:</b>					
<i>mec f</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	55	30	30	481
<i>mec r</i>	AGT TOT GCA GTA CCG GAT TTG C				
$\alpha$ 2,2	CCTATATCATCAATCAGTACGT	55	30	35	690
$\beta$ 2, 2-1	GCC TTG ATA ATA GCC TTC				
$\alpha$ 3,2	AGG CAT CAA TGC ACA AAC ACT	55	30	35	920
$\beta$ 2,2-1					
<i>ccrA3 f</i>	CAC GTT AAA CAT GCT GCA TCC	55	30	35	600
<i>ccrA3 r</i>	TAG CCT TCT TGA GCG CGT CG				
<i>KDPk f</i>	GTG CAC GAA CAG AGG AAC	55	30	35	197
<i>KDPk, 2 r</i>	CAA GGA CTG ATT TCG CAT CG				
<i>ccrC6 f</i>	ATG AAT TCA AAG AGC ATG GC	55	30	35	120
<i>ccrC8 r-2</i>	TGA ACG TTC GAT TGA TCC TA				
<i>spa 1112 f</i>	TAA AGA CGA TCC TTC AGT GAG	55	30	35	200 - 600
<i>spa 1514r</i>	CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT				

Unterteilung der SCCmec-Elemente des Typs IV:	Sequenz (5'-3')	Ta (°C)	Tp (sec.)	Zyklen	Amplifikation (bp)
<i>IVa f</i>	TTT GAA TGC CCT CCA TGA ATA AAA T	50	30	30	
<i>IVa r</i>	AGA AAA GAT AGA AGT TCG AAA GA				
<i>IVb f</i>	AGT ACA TTT TAT CTT TGC GTA	50	30	30	
<i>IVb r</i>	AGT CAT CTT CAA TAT CGA GAA AGT A				
<i>IVc f</i>	TGG GGT ATT TTT ATC TTC AAC TC	50	30	30	
<i>IVc r</i>	TGG GAT TTT AAA GCA GAA TAT CA				
<i>IVd f</i>	ACG GGA GAT TAG GAG ATG TTA T	50	30	30	
<i>IVd r</i>	CAG CCA TCA ATT TTG TTT CAC C				

## Publikationsverzeichnis

**Abdelbary MMH, Wittenberg A, Cuny C, Layer F, Wieler L, Skov R, Larsen J, Hasman H, Fitzgerald JR, Wagenaar JA, Böse R, Nübel U & Witte W. (2014)** Phylogenetic Analysis of *Staphylococcus aureus* CC398 Reveals a Sub-Lineage Epidemiologically Associated with Infections in Horses. **PLoS ONE** 9(2): e88083.

## Tagungsbeiträge

**Abdelbary MMH, Wittenberg A, Cuny C, Layer F, Wieler L, Skov R, Larsen J, Hasman H, Fitzgerald JR, Wagenaar JA, Böse R, Nübel U & Witte W (2013).** The population structure of ST398 and the emergence of a horse-associated sub-clone. 3rd ASM-ESCMID Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals; Kopenhagen, Dänemark.

**Wittenberg A, Cuny C, Kurt K, Wieler L.H., Walther B,H, Fitzgerald JR, Witte W & Nübel U. (2010)** Population structure of methicillin-resistant *S.aureus* CC398. 3. Gemeinsame Tagung von VAAM und DGHM; in Hannover, Deutschland.

## Posterbeiträge

**Abdelbary MMH, Wittenberg A, Cuny C, Layer F, Wieler L, Skov R, Larsen J, Hasman H, Fitzgerald JR, Wagenaar JA, Böse R, Nübel U & Witte W (2013).** The population structure of ST398 and the emergence of a horse-associated sub-clone. German Symposium on Zoonoses Research; in Berlin, Deutschland.

**Abdelbary MMH, Wittenberg A, Cuny C, Layer F, Wieler L, Skov R, Larsen J, Hasman H, Fitzgerald JR, Wagenaar JA, Böse R, Nübel U & Witte W (2013).** The population structure of ST398 based on mutation discovery. Congress of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); in Berlin sowie 64. Annual Meeting of German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM); in Hamburg, und German Symposium on Zoonoses Research; in Berlin, Deutschland.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die Anteil an der Anfertigung dieser Dissertation hatten. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Witte für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung aller Isolate und die Betreuung am Robert Koch-Institut.

Herrn Prof. Dr. Wieler für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit und die Begleitung des Promotionsverfahrens als Mentor.

Herrn PD Dr. Nübel für die Betreuung, die Ratschläge und die immer entspannte und freundliche Atmosphäre während meiner Zeit am RKI.

Frau Dr. Cuny für die Zusammenarbeit während der Zeit am RKI, die Bereitstellung der Isolate und der dazugehörigen Daten.

Frau Dr. B. Walther für die gute Beratung, Korrektur, Unterstützung sowie die Denkanstöße an der FU Berlin.

S. Vincze für die Erläuterungen und Unterstützung bei der Arbeit an PCRs und Microarrays.

Den Mitarbeitern des RKI Wernigerode und besonders der FG13 für die freundliche Aufnahme, die entgegengebrachte Offenheit und die Assistenz.

Annette Weller, Heike Illiger, Crista Cuny, Birgit Pasemann und Mike Henkel für die Zusammenarbeit und umfassende Unterstützung im Labor.

Kevin Kurt danke ich für die Einführung in dieses spannende Thema, die lustigen Stunden, Diskussionen, Lachattacken, die Unterstützung und Hilfe, die bis zum heutigen Tag anhält.

Rock on!!!

Meinen Vierbeinern für die nötige Abwechslung an schweren Tagen.

Meinen lieben Eltern, Heike und Jörg Wittenberg sowie Petra Horn und Claudia Bliesener für ihre wertvolle Unterstützung auf meinem Weg, ohne die ich niemals bis hierhin gekommen wäre.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Bad Doberan, den 20.02.2014

Anne Wittenberg