

2 Schrifttum

2.1 Taxonomische Einordnung und wesentliche Charakteristika von *S. aureus*

Bakterien der Gattung *Staphylococcus* gehören zur Familie der *Micrococcaceae* (6). Das Genus *Staphylococcus* enthält gegenwärtig ca. 51 Spezies und Subspezies (www.dsmz.de; www.bacterio.cict.fr). Staphylokokken sind unbewegliche, grampositive Kugelbakterien mit einem Durchmesser von 0,5- 1,5 µm, die fakultativ anaerob wachsen und keine Sporen bilden. Sie bilden ein eisenhaltiges Enzym (Katalase), das sie als wichtiges Merkmal von den Streptokokken abgrenzt. Im mikroskopischen Bild können Staphylokokken einzeln, aber auch als traubenförmige Haufen (Staphylé: Weintraube) beobachtet werden. Staphylokokken sind anspruchslos und wachsen auf fast allen einfachen Nährmedien sowie in Gegenwart von bis zu 10% NaCl zwischen 18 - 40°C. *S. aureus*- Kolonien können auf dem Kulturmedium neben grau-weiß und grau-gelb auch eine gold-gelbe Pigmentierung (verursacht durch Karotinoide; Licht- und UV-Schutz) zeigen, die zur Benennung dieser Spezies geführt hat (3; 13). Das Genom von *S. aureus* besitzt eine Größe von ca. 2,8 Mbp (134). Eines von (bislang) 8 vollständig sequenzierten *S. aureus*- Genomen findet sich unter: <http://www.sanger.ac.uk/> (MRSA252). Eine stets aktuelle Online-Übersicht findet sich unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Einige Staphylokokken-Spezies produzieren das Enzym Plasmakoagulase (namentlich: *S. aureus*, *S. intermedius*), einen Virulenzfaktor, mit dem sie analog dem Thrombin die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin im Blutplasma unterschiedlicher Spezies bewirken. Dieser Faktor begünstigt die Anheftung und Etablierung der Staphylokokken nach der Invasion in den Körper, da ein Fibrinnetz eine gute Haftgrundlage darstellt und so etwaige Abwehrzellen auf Distanz gehalten werden. Aus diesem Grund unterscheidet man klinisch koagulase-negative (KNS) von koagulase-positiven Staphylokokken und Spezies mit variablem Koagulaseverhalten (*S. hyicus*).

2.2 Bedeutung von *S. aureus* als Krankheitserreger bei Menschen und Tieren

S. aureus ist weltweit verbreitet und gehört zu den gewöhnlichen Besiedlern von Haut, Hautdrüsen sowie der Schleimhaut bei Menschen und zahlreichen Tierarten (6; 52). Viele Staphylokokken-Spezies sind Bestandteile der Normalflora von Mensch und Tier (17; 47; 52; 63; 64; 111). Dennoch handelt es sich bei *S. aureus* (ebenso wie bei *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* u.a.) um fakultativ pathogene Keime, die durch begünstigende Umstände (z.B. Immunsuppression, Diabeteserkrankung, Hygienemangel) eine lokale oder systemische Erkrankung auslösen, die unbehandelt nicht selten auch zum Tod des erkrankten Individuums führt (67; 104).

In der Veterinärmedizin ist *S. aureus* als Verursacher von pyogenen und invasiven Prozessen (Abszessen, Furunkeln, Empyemen, Wundinfektionen, Otitis media, Parotitis, Pneumonie, Endokarditis, Sepsis, Botryomykosen, Osteomyelitis, Cystitis, Fremdkörper- und Implantatinfektionen) sowie von toxinvermittelten Erkrankungen (bei Tieren: vorrangig Beteiligung an Dermatitiden mit exfoliativen Toxinen) von großer Bedeutung (50; 87; 131). Nicht zuletzt ist die Kontamination von Lebensmitteln mit toxinbildenden *S. aureus* eine mögliche Ursache für schwere Lebensmittelintoxikationen des Menschen (55; 120; 143).

Durch die hohe Tenazität von *S. aureus* gegen Trockenheit und Wärme (9; 88) und die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen (17; 62; 71; 130) ist die Bekämpfung schwierig und erfordert ein qualitativ hochwertiges Hygienemanagement (1), da die unbelebte Umgebung

(z.B. Kittel, Luft, Inventar, glatte Flächen, Türgriffe) monatelang mit infektiösfähigen Keimen behaftet sein kann.

Wie auch koagulasenegative Staphylokokken, adhärirt *S. aureus* sehr gut an hydrophoben Oberflächen wie Plastik und Edelstahl (143), so dass u.a. auch Untersuchungsmaterialien und Geräte (z.B. Endoskope) ein Übertragungsrisiko bergen.

2.3 Pathogenität und Virulenzeigenschaften von *S. aureus*

S. aureus sind einer der Hauptverursacher von bakteriellen Infektionskrankheiten in der Human- und Veterinärmedizin und als Erreger hospital-assoziiertes (ha) Erkrankungen (5; 40; 95) seit vielen Jahren im hospitalnahen Bereich weit verbreitet (21; 133). Grundsätzlich lassen sich die pathogenen Wirkungen von *S. aureus* zwei Klassen von Virulenzfaktoren zuordnen:

- a) zellwandassoziierte Proteine
- b) extrazelluläre Toxine

Tabelle 1: Wichtige Virulenzmerkmale mit ihren Angriffspunkten und Wirkungen

Virulenzmerkmal	Lokalisation	Angriffspunkt	Wirkung
Protein A	Zellwandassoziiertes Protein	Fc-Stück von Immunglobulin G (IgG)	Hemmung phagozytierender Zellen; Opsonierung behindert
Fibronectin-bindendes Protein	Zellwandassoziiertes Protein	Multiadhäsionsproteine in der extrazellulären Matrix	Ermöglicht die Anheftung und Kolonisierung an vielen Orten (z.B. an verletztem Gewebe, Koagula und Thromben)
Kollagen-bindendes Protein	Zellwandassoziiertes Protein	direkte Bindung eines der Hauptstrukturproteine, Kollagen	Häufigste Ursache bakterieller Arthritis und Osteomyelitis
Fibrinogen-bindendes Protein (Clumping Faktor A+B)	Zellwandassoziiertes Protein	Bindung und Aktivierung von Fibrinogen	Aktivierung von Thrombozyten; Aktivierung der Gerinnungskaskade
Koagulase	Oberflächenassoziiertes Exotoxin	Bindet an Prothrombin, bildet Staphylothrombin-Komplexe	Fibrinogenaktivierung, unterstützt Oberflächenanheftung
Elastin-bindendes Protein	Oberflächennahes Exotoxin	Bindet an Bestandteile der extrazellulären Matrix (Elastin) von elastischem Gewebe	Beteiligt an Gewebsanheftung
Staphylokinase	Extrazelluläres Protein	Aktiviert eine Serin-Protease mit breitem Spektrum	Fibrinolyse, erhöht das invasive Potential

Virulenzmerkmal	Lokalisation	Angriffspunkt	Wirkung
α - Toxin	Sekretorisches Protein	Porenbildung in der Membran von Körperzellen, Aktivierung von Zytokinen, Koagulation	Endothelzellschädigung, dermatonekrotische Wirkung, intravasale Koagulation
β - Toxin	Sekretorisches Protein	Sphingomyelinase, zerstört Erythrozyten, Monozyten	Hämolyse, hämorrhagische Organveränderungen; sclerale Ödeme
Leukozidin und γ -Toxin (Panton-Valentine-Leukozidin)	Sekretorisches Protein (2 Komponenten)	stimuliert und zerstört polymorphkernige Leukozyten, zytotoxisch	Dermatonekrose
Exfoliative Toxine	Sekretorisches Protein	Bindung an keratohyaline Granula im Stratum granulosum	Exfoliative Dermatitis
Toxische Schock Syndrom Toxin 1 und Enterotoxine	Sekretorisches Protein	Superantigene Wirkung, Bindung an MHCII, danach starke T-Zell-Aktivierung	Immunsuppression, Fieber, endotoxischer Schock, Emesis, Lebensmittelvergiftungen
DNase	Sekretorisches Protein	Nukleinsäuren	Zerstörung des Erbgutes
Kapsel	Oberflächen-gebundene Schleimkapsel	Abwehrzellen, Gefäße	Schutz der Zelle vor Abwehr, Beteiligung an Biofilmen
Katalase	Sekretorisches Protein	Sauerstoffradikale	Hemmung der Wirkung von Sauerstoffradikalen

Abbildung nach Foster(6).

2.4 Resistenzen von *S. aureus*

Gefürchtete Infektionskrankheiten wie Pest, Cholera und Fleckfieber waren vom Mittelalter bis ins 19. Jahrhundert weit verbreitet. Mit der Entdeckung des Penicillins 1928 und der Entwicklung weiterer Antibiota in den nachfolgenden Jahren wurden viele vormals häufig tödliche bakterielle Infektionskrankheiten heilbar. Jedoch traten stets früher oder später (mit wenigen Ausnahmen) nach dem Einsatz eines neuen Wirkstoffes bakterielle Resistenzen auf (10). Bakterielle Resistenzen entstehen durch Mutation oder durch Akquirierung von genetischem Material (20), wobei ein Wirkstoff niemals die Entwicklung von Resistenzgenen induziert, vielmehr haben Mikroorganismen mit Resistenzdeterminanten gegenüber "sensiblen" Vertretern einen Selektionsvorteil, den sie durch ihre im Vergleich zum Menschen kurze Generationszeit leicht nutzen können (10).

Jeder Einsatz eines Antibiots übt nicht nur auf den zu bekämpfenden Erreger, sondern auch auf die Normalflora einen Selektionsdruck aus. Ferner sind *S. aureus* seit jeher als Wundinfektionserreger im hospitalnahen Bereich weit verbreitet, so dass auch von dieser

Seite resistenterer Vertreter dieser Gattung einen Vorteil erlangen. Nachfolgend wird eine Übersicht über die wichtigsten Resistenzmechanismen von *S. aureus* gegeben.

2.4.1 Resistenz von *S. aureus* gegen β -Lactam-Antiinfektiva

β -Lactam-Antiinfektiva wirken bakterizid indem sie an Penicillin-bindende Proteine (PBP) der Zelloberfläche binden. Dabei inhibieren sie ein für die Vitalität des Bakteriums essentielles Enzym der Zellwandbildung, eine Transpeptidase. Diese wiederum ist Teil eines bifunktionellen Komplexes, der einerseits Disaccharid-Einheiten (Glycan) durch das Enzym Transglycolase verbindet, sowie andererseits die Stabilität der Zellwand durch Vernetzung der Polypeptide zu kurzen Peptidketten durch Transpeptidation bedingt (132). Durch die Inaktivierung der Transpeptidaseeinheit ist die Synthese der expandierenden Zellwand empfindlich gestört, der osmotische Druckgradient zwischen intra- und extrazellulärem Raum wächst jedoch, die Balance zwischen Wachstum und Morphologie kann nicht weiter aufrechterhalten werden (16).

Mikroorganismen verfügen über zahlreiche Strategien, um sich der letalen Wirkung der β -Lactame zu entziehen. Nachfolgend werden die beiden Hauptmechanismen dieser Resistenzausbildung bei Staphylokokken näher erläutert.

Schon 1944 ist ein extrazelluläres Enzym bei Staphylokokken beschrieben worden, welches die Wirkung von Penicillin hemmt (11). Die Gruppe der β -Lactamasen ist sehr vielfältig und bei gramnegativen wie grampositiven Spezies weit verbreitet (27; 54; 91).

Die mikrobielle Synthese der β -Lactamase (*blaZ*) führt zur Hydrolyse des β -Lactamrings und so zu einer Inaktivierung der antiinfektiven Wirkung. Staphylokokken, die über eine β -Lactamase verfügen, tragen auf ihrer Oberfläche vereinzelt Prometalloproteasen (BlaR1). Diese sind Sensor-Proteine, die durch Bindung eines β -Lactam-Antibiotikums an ihre Penicillin-bindende Domäne eine schnelle autokatalytische Spaltung in Gang setzen, die eine aktivierte Metalloprotease hervorbringt. Diese Protease spaltet entweder direkt oder in Verbindung mit Cofaktoren das Regulatorprotein BlaI, wobei ein 11-kDa großes Fragment mit einer DNS-bindenden Domäne (7-kDa) und ein weiteres Fragment mit einer Dimerisations-Domäne (3-kDa) entsteht. Durch diesen Prozess wird die repressive Wirkung von BlaI aufgehoben und *blaZ* kann transkribiert werden. β -Lactamase wird produziert und führt zur Resistenz von Staphylokokken gegen β -Lactamanbasierte Antibiotika (141). Penicillinase-feste Antibiotika wie Cephalosporine und Carbapeneme werden hingegen in ihrer Wirkung durch die β -Lactamasebildung nicht gehemmt (31).

MRSA sind laut National Committee for Clinical Laboratory Standards (142) definiert als

S. aureus, bei denen entweder
das für die Resistenz verantwortliche *mecA* Gen
(genotypisch)

oder

das durch dieses Gen kodierte zusätzliche
Penicillin bindende Protein PBP2a;
(phänotypisch)

nachgewiesen wird

Die durch das *mecA*-Gen determinierte Methicillinresistenz führt zum Wirkverlust aller Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme. *mecA* kodiert für das Penicillin-bindende-Protein PBP2a. Staphylokokken besitzen fünf verschiedene membrangebundene Penicillin-bindende Proteine, die die Quervernetzung der Peptidoglycanschichten der Zellwand durch eine Transpeptidation bewirken. Die kovalente Bindung von β -Lactamen an das katalytisch aktive Zentrum (Serin) der PBPs 1-3 ist letal. PBP2a zeigt eine 1000-fach niedrigere Affinität

zu allen β -Lactamantibiotika und übernimmt in Gegenwart eines Antiinfektivums dieser Klasse die essentielle Transpeptidase-Reaktion (132).

Das *mecA*-Gen befindet sich auf einem etwa 20 - 40kb großen chromosomalen DNA-Fragment (*mec*-Komplex) (61) in der Nähe des Replikationsursprungs (115) von *S. aureus*.

Der *mec*-Komplex seinerseits befindet sich auf einem mobilen genetischen Element, der chromosomalen Staphylokokken Genkassette (*SCCmec*) (93). Diese Genkassette kann von unterschiedlichen *S. aureus*-Populationen aufgenommen und weiterverbreitet werden, so dass das Ereignis der MRSA-Entstehung keinen Einzelfall darstellt. Sogar unterschiedliche Genkassetten-Typen können in der gleichen Genotyp-Linie vorkommen, was wiederum als Indiz für mehrere *SCCmec*-Einträge in eine erfolgreich adaptierte Genotyplinie (z.B.: ST8) angesehen wird (119).

Die Regulation der Expression des *mecA*-Gens wird von zwei weiteren Genen, die sich ebenfalls in diesem Komplex befinden, gesteuert. Das *mecR1*-Gen kodiert für ein *mecA*-Inducer-Protein, welches sich aus einer penicillinbindenden und einer transmembranösen Domäne zusammensetzt. Das zweite regulatorisch aktive Gen, *mecI*, stellt einen starken Repressor für *mecA* dar. Beide Gene zeigen eine große Homologie zu *blaR1* und *blaI*, den Regulatorgenen für die β -Lactamase-Produktion (103). Studien haben gezeigt, dass auch diese Regulatorgene alternativ die Expression von *mecA* steuern können (35).

Die Mobilität dieser Genkassette wird durch ein Paar von Rekombinase-Genen aus der Familie der Invertasen-Resolvasen (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*) ermöglicht, von denen bislang 5 Kombinations- Varianten beschrieben wurden (81; 93; 97). Jede Genkassette inseriert an der gleichen Stelle im Staphylokokken-Genom, am 3`-Ende (*attBSCC*) eines "open reading frame" (ORF) mit bislang unbekannter Funktion (92).

2.4.2 Resistenzen gegen nicht- β -Lactam Antiinfektiva

Resistenzen gegen Glykopeptid-Antibiotika (z.B. Vancomycin)

Viele Jahre lang waren *S. aureus* (und damit MRSA) durchweg sensibel gegen das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin. Deshalb ist die chemotherapeutische Intervention mit diesem Reserveantiinfektivum eine häufige MRSA-Therapie und vielfach "Mittel der (letzten) Wahl" bei schweren MRSA-Infektionen.

Grundsätzlich unterscheidet man bei Staphylokokken zwei Formen der Glykopeptidresistenz. Seit 1997 gibt es Berichte über Glycopeptid-intermediär-resistente *S. aureus* (115) aus verschiedenen Ländern. Durch Transfer der *vanA*-Determinante (vermutlich von resistenten Enterokokken) entstehen Vancomycin-resistente MRSA, wie sie erstmals im Jahr 2002 in den USA aufgetreten sind (129). Diese Entwicklung wird weltweit mit größter Sorge beobachtet (33; 70; 90).

Eine Änderung der Peptidoglycan-Zusammensetzung der Zellwand, die zu einer Verdickung führt, steht im Verdacht, die herabgesetzte (intermediäre) Empfindlichkeit gegen Vancomycin zu verursachen. Käme es zu einer Verbreitung von Glykopeptid-intermediär-resistenten MRSA-Stämmen (VISA, GISA) oder der erstmals 2002 in den USA beschriebenen vollständig Vancomycin-resistenten MRSA (VRSA), so würde dies die therapeutischen Möglichkeiten von MRSA-Infektionen weiter dramatisch einschränken (100; 135). Sollten sich die resistenzvermittelnden Gene (*vanA*) in *S. aureus*-Linien etablieren können, so besteht kaum ein Zweifel daran, dass diese auch Eingang in hochresistente hospitaladaptierte MRSA-Populationen finden werden (134).

Resistenzen gegen Makrolide und Lincosamide

Makrolide (z.B. Erythromycin, Spiramycin) sind Antibiotika mit einem Lactonring und der glycosidischen Bindungen an einen Zucker bzw. Aminozucker. Die Größe des Lactonrings sowie der Aufbau der Zuckerkomponente dienen der Unterscheidung einzelner Vertreter dieser bakteriostatisch wirkenden Klasse. Die Wirkung dieser Chemotherapeutika beruht auf der Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese an der 50S-Einheit der Ribosomen (22). Dabei behindern diese Wirkstoffe die bakterielle Proteinsynthese durch Bindung an dem enzymatisch aktiven Zentrum (Peptidyltransferase), wobei sie den wachsenden Proteinfaden, der durch einen tunnelähnlichen Gang in der Mitte des Ribosoms laufen muss, abbrechen bzw. blockieren. Auf diesem Weg wird die Translation der Messenger-RNS unterbrochen (31). Die Bindungsstelle der Makrolide erstreckt sich nur über einige wenige Basen, jede dieser Wechselwirkungen ist von Bedeutung für die Wirksamkeit des Antibiotikums (76). Die meisten Resistenzen gegen Makrolid-Antibiotika in *S. aureus* und vielen anderen Bakterien beruhen auf der Methylierung einer einzigen Base (meist A2058) der 23S rRNA. So wird die Bindungsintensität des Antibiotikums stark abgeschwächt bzw. aufgehoben (76). Dennoch soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass auch Effluxmechanismen und enzymatische Inaktivierung zur Ausbildung einer Resistenz führen können (31).

Resistenzen gegen Aminoglycoside

Aminoglycoside (z.B. Neomycin, Kanamycin, Streptomycin, Tobramycin, Gentamycin, Amikacin) enthalten den zyklischen Aminoalkohol Streptamin, der mit zwei Aminozuckern glycosidisch verbunden ist. Die Art und Anzahl der Aminozucker unterscheidet die einzelnen Wirkstoffe. Aminoglycoside binden an die 30S-Untereinheit der Ribosomen und induzieren dort Fehlablesungen der mRNA, so dass falsche Proteine produziert werden. Diese sog. "Nonsens"-Proteine sind für den Metabolismus der Bakterien unbrauchbar (bakterizide Wirkung) (22). Man unterscheidet drei mögliche Resistenzmechanismen, die jeweils zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Resistenz gegen Aminoglycoside führen. Mutationen in den Genen, welche für die ribosomalen Proteine kodieren, können zu einer Strukturänderung in den Ribosomen führen, welche die Bindung der angesprochenen Wirkstoffe verschlechtern oder ganz unterbinden (34).

Ein zweiter Resistenzmechanismus ist an die Aufnahme der Antibiotika über die Zellmembran gekoppelt. Veränderungen an dieser Stelle (z.B. durch Mutationen) führen zu einer Impermeabilität der Zellwand und somit zu einem Versagen der antiinfektiven Therapie. Eine dritte Resistenzform tritt bei der Bildung von Aminoglycosid-inaktivierenden Enzymen auf, von denen ca. 40 bekannt sind. Aminoglycoside, die an der Amino- oder den Hydroxyl-Gruppen enzymatisch modifiziert wurden, können keine Bindung zum bakteriellen Ribosom aufbauen, die Proteinsynthese kann ungehindert fortgesetzt werden (34).

Resistenzen gegen Tetracycline

Die bakteriostatisch wirkenden Tetracycline (Doxycyclin, Oxytetracyclin u.a.) hemmen die bakterielle intrazelluläre Proteinsynthese. Tetracycline gelangen durch einen energie-abhängigen Transport in die Zielzellen. Sie binden an die kleine (30S) Ribosomen-Untereinheit des 70S-Ribosoms der Bakterien und verhindern sterisch die Anlagerung des Aminoacyl-tRNA-Komplexes an die ribosomale Akzeptorstelle. Dies führt zur Hemmung der Elongation wachsender Peptidketten. Daneben bewirken Tetracycline eine Hemmung der Zellwand-Biosynthese. Resistenzen gegen Tetracycline beruhen vorrangig auf dem Vorhandensein eines aktiven Auswärtstransports (Efflux-Pumpen), die zu einer starken Absenkung der

intrazellulären Akkumulation des Wirkstoffs führen. Eine Tetracyclin-Resistenz kann außerdem auf einer Strukturänderung der ribosomalen Bindungsstelle beruhen. Die genetischen Informationen sind häufig auf Resistenzplasmiden kodiert, die die Resistenz chromosomal und auch extrachromosomal übertragen. Bei Staphylokokken findet man häufig Resistenzgene (z.B. *tetM*) als Bestandteile von Transposons (z.B. Tn916), die auf diesem Weg transloziert werden können (34).

Resistenzen gegen Sulfonamide und Trimethoprim

Sulfonamide und Trimethoprim erzielen ihren bakteriziden Effekt durch Inhibierung der Folsäuresynthese, deren Derivate essentiell sind für die Synthese vieler Aminosäuren und Nukleotide. Dadurch kommt es primär zu einem letalen intrazellulären Folsäuremangel. Sulfonamide sind kompetitive Inhibitoren der Para-Aminobenzoensäure, einem Ausgangssubstrat bei der Synthese von Folsäure, so entstehen nicht verwertbare Sulfonamid-Analoga des eigentlichen Reaktionsproduktes. Der finale Schritt bei der Folsäuresynthese, die Reduktion von Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure wird durch den Wirkstoff Trimethoprim verhindert, welcher zu dem Enzym Dihydrofolsäure-Reduktase (DHFR) eine 1000fach stärkere Bindung eingeht als das eigentliche Substrat. Resistenzen gegen diese Kombinationstherapie entstehen durch eine p-Aminobenzoensäure-Überproduktion (*sulA*) und durch Reduktion der Affinität (chromosomal; *dhfrB*) von Trimethoprim für die DHFR (8).

Resistenzen gegenüber Gyrasehemmer

Gyrasehemmer (Fluorochinolone) sind heterozyklische Carbonsäuren (Ciprofloxacin, Enrofloxacin) mit bakterizider Wirkung. Sie hemmen die bakterielle Transkription und Replikation. Fluorochinolonresistenz ist das Ergebnis einer spontanen Mutation an den primären Zielproteinen des Wirkstoffs, die GrlA- Untereinheit der Topoisomerase IV (trennt DNS-Stränge) und die GyrA-Untereinheit der DNS-Gyrase. Eine Aminosäuresequenzänderung an kritischen Punkten der Enzym-Bindungsstellen erniedrigt die Affinität beider Ziele für Fluorochinolone. Auch durch Induktion einer Efflux-Pumpe (*norA*) kann eine Resistenzerhöhung herbeigeführt werden (96; 110).

2.5 Bedeutung von MRSA

Bedeutung von MRSA in der Humanmedizin

Im Jahr 1961 wurde erstmals in England von Methicillin-resistenten Staphylokokken berichtet (2), also nur kurz nach der Einführung von Methicillin im Jahr 1959. Seitdem sind MRSA-Infektionen weltweit zu einem großen Problem avanciert. Insbesondere in Krankenhäusern und andere Gesundheitseinrichtungen sind multiresistente *S. aureus* seit vielen Jahren einer der Hauptverursacher nosokomialer Infektionen (36; 49; 77), da die verhältnismäßig leichte Transmission zur Verbreitung von MRSA zwischen Patienten sowie zwischen Patienten und Personal beiträgt (25; 119).

Nosokomiale Infektionen (gr. Nosokomeion: Krankenhaus) sind Infektionen, die durch Ansteckung in einem Krankenhaus oder einer ähnlichen Einrichtung des Gesundheitswesens erworben werden (engl: hospital-acquired infections; ha-). Sie sind das bedeutendste Problem der Hygiene und des Hygienemanagements in Gesundheitseinrichtungen. Nosokomiale Infektionen (NI) erwerben ca. 3,5% aller Krankenhauspatienten und bis zu 25% der Patienten auf Intensivstationen. Die häufigsten Infektionen sind: Infektionen der Harnwege mit ca. 42%, Pneumonien mit ca. 20%, Wundinfektionen mit ca. 16% und Bakteriämien / Septitiden mit ca. 8 % (69). Die häufigsten Krankheitserreger sind Enterokokken sp. 34%,

Staphylokokken sp. 30 %, Pseudomonas sp. 28% und Pilze mit 17%. Diese Zahlen sind nur als sehr grobe Richtgrößen zu verstehen, da die NIDEP-Studie von 1995 gezeigt hat, dass zwischen einzelnen Krankenhäusern erhebliche Varianzen für die Prävalenz von NI besteht (21). Risikofaktoren sind:

- Verweildauer des Patienten im Krankenhaus von > 48 Stunden
- maschinelle Beatmung
- Polytraumatisierte-Patienten
- Verweilkanülen für Infusionen
- Urinableitung über Harnkatheter

Die bei NI in Deutschland am häufigsten isolierte Spezies ist *S. aureus* (13,3%), wobei es sich in 13,1% dieser Fälle um MRSA handelt, gefolgt von *Enterococcus spp.* (11,0%), *E.coli* (11,0%), *P. aeruginosa* (9,7%) und *C. albicans* (8,8%) (89).

Als Bestandteil der körpereigenen Hautflora gelangen MSSA (Methicillin-sensitive *S. aureus*) ebenso wie MRSA in Krankenhäuser, Altenheime und andere Gesundheitseinrichtungen. Häufig sind *S. aureus* im Nasenvorhof des Menschen zu finden (68), ebenso am Haaransatz, unter den Achseln und im Inguinalbereich.

Die bereits angesprochene hohe Tenazität dieses Keims ist ein weiterer Vorteil zur Verbreitung durch Schmierinfektionen über Türklinken, Geräte, Instrumente, Telefone und ähnliche Gegenstände (28; 44; 41; 108). Eine postoperative Wundinfektion durch MRSA führt zu einer signifikant höheren Mortalitätsrate (13% gegenüber einer Wundinfektion durch MSSA), einem durchschnittlich fünf Tage längeren Krankenhausaufenthalt sowie zu erheblichen Mehrkosten für Therapie, Hygienemaßnahmen und räumliche Isolation (78). Die Isolation von MRSA aus postoperativen Wunden ist außerdem häufig assoziiert mit einer niedrigen Rate an primären Wundheilungen (51). Auch postoperative Faktoren können eine MRSA-Infektion begünstigen. So sind u. a. ein hohes Lebensalter, eine Operationsdauer über vier Stunden und die postoperative Gabe von antiinfektiven Wirkstoffen über einen Tag hinaus mit einem erhöhten MRSA-Risiko verbunden (98).

MRSA-Infektionen stellen eine der größten Herausforderungen für die Krankenhaushygiene dar. In der Humanmedizin sollen infizierte Patienten streng isoliert (bei mehreren Fällen Kohortenisolation) und nur von speziell geschultem Personal in entsprechender Schutzkleidung (Handschuhe, Mundschutz, Kittel) versorgt werden. Insbesondere immunsupprimierte Individuen sind anfällig für eine MRSA-Infektionskrankheit (121), die im Ernstfall häufig nur mit Reserve-Glycopeptid-Antibiotika (Vancomycin, Teicoplan) zu bekämpfen und mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist (68). Der Hauptübertragungsweg für MRSA sind die (unzureichend gereinigten) Hände des Personals (7). MRSA-besiedelten Pflegekräften sollte daher in der Regel der direkte Kontakt zu Patienten untersagt bleiben, bis sie eine erfolgreiche Sanierung mikrobiologisch nachweisen können (143). In vielen humanmedizinischen Kliniken werden Patienten und Personal regelmäßig auf MRSA untersucht und ein MRSA-Ausbruch unterliegt sogar der Meldepflicht gemäß §6 Absatz 3 Infektionsschutzgesetz (IfSG).

Derzeit sind in Deutschland ca. 20% aller in der Humanmedizin isolierten klinischen *S. aureus*-Isolate als Oxacillin-resistent einzustufen (Quelle: Paul-Ehrlich-Gesellschaft, 2003; www.p-e-g.de)

Bedeutung von MRSA in der Veterinärmedizin

Erstmals wurde 1975 von Devriese et al. über das Auftreten Methicillin-resistenten *S. aureus* als Mastitiserreger in belgischen Rinderherden berichtet (29). Seit den späten 90`er Jahren wurden weltweit zunehmend sporadische MRSA-Fälle dokumentiert. Hartmann et al.

publizierten 1997 den Fall einer MRSA-positiven postoperativen Wundinfektion bei einem Pferd in Wisconsin, USA (80). Ebenfalls 1997 erschien ein Artikel in Japan, in dem 15 MRSA-Isolate von Pferden mittels PFGE genetisch analysiert wurden. Die Isolate stammten aus equinen Metritiden (gesammelt zwischen 1989-1992) sowie von einem Hengst mit Dermatitis (117). Im Juni 2002 berichteten kanadische Veterinär-Mikrobiologen über das Auftreten von MRSA bei Pferden und Hunden in Kanada (39). In den Niederlanden wurde 2003 erstmalig MRSA in einer postoperativen Wundheilungsstörung bei einem Hund diagnostiziert (118). Auch in der Veterinärmedizin ist die Verbreitung von MRSA über Einrichtung und Gebrauchsgegenstände bereits nachgewiesen, wobei bei Pferden insbesondere Stallwände eine mögliche Kontaminationsquelle darstellen (73). Ebenso können nahezu alle Utensilien, die alltäglich im tiermedizinischen Bereich eingesetzt werden, wie z.B. Schermaschinen, Fadenmesser und Fixierschlingen als Vehikel für die Verbreitung von MRSA dienen (24).

Multicenter-Studien wie die oben genannte NIPED-Studie sind für den veterinärmedizinischen Bereich leider nicht verfügbar. Dennoch weisen zahlreiche Untersuchungen darauf hin, dass für nosokomiale Infektionen in der Veterinärmedizin ähnliche Grundsätze gelten wie in der Humanmedizin. So warnen Archambault et al. (39) vor dem Hauptverbreitungsweg „ungewaschene Hände“ und weisen zu Recht darauf hin, dass auch besiedelte Oberflächen und unzureichend gereinigtes Equipment eine Übertragungsgefahr bergen (siehe auch 5.3.4). Eine gute Händehygiene ist die bedeutendste Prophylaxemaßnahme gegen die Verbreitung von nosokomialen Infektionen, dies gilt uneingeschränkt auch und gerade in der Veterinärmedizin (39).

Die Auswertung publizierter Berichte der jüngeren Zeit zeigt, dass sich nachgewiesene Infektionskrankheiten durch MRSA bei Hunden sowie Pferden zunehmend häufen. Eine neue Untersuchung zum Auftreten von MRSA als nasaler Kommensale von hospitalisierten Hunden zeigt, dass auch diese Form des Auftretens von MRSA in der Veterinärmedizin möglich ist und als möglicher Transmissionsfaktor sowie als Ursache für eine Autoinfektion in Betracht zu ziehen ist (24). Dennoch bleibt die Prävalenz von MSSA/MRSA kolonisierten Kleintieren nicht näher bestimmt, seriöse Quellen schätzen diese jedoch als gering ein (59). Bei Pferden scheint die nasale Prävalenz möglicherweise ebenfalls eher niedrig zu sein, wie eine Untersuchung aus den Niederlanden zeigt (138).

Grundsätzlich ist die Frage nach der Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von *S. aureus* zwischen Menschen und Tieren zu stellen, unabhängig davon, ob es sich um MSSA oder MRSA handelt. Ein enger Tierkontakt wie bei Mitarbeitern von Schweinehaltungsbetrieben zu ihren Tieren kann als Ursache für einen ständigen Austausch von *S. aureus* angenommen werden, wie durch Armand-Lefevre et al. gezeigt werden konnte (75). Schon die Typisierung der zwischen 1993 und 1994 in einer Tierklinik für Pferde (Michigan, USA) isolierten MRSA von Tieren und Mitarbeitern ließen mit hoher Wahrscheinlichkeit den Schluss zu, dass die Übertragung von MRSA zwischen Mensch und Tier möglich ist (84). Die von Baptiste et al. (124) publizierten Daten aus englischen Tierkliniken belegen, dass MRSA zwischen Hunden und Personal der Kliniken ausgetauscht werden können, ohne dass in diesem Fall die ursprüngliche Infektionsquelle bestimmt werden konnte. Einen besonders schwerwiegenden Zusammenhang zeigt auch ein Fall von wiederholter MRSA-Reinfektion eines Menschen mit diabetischen Unterschenkel-Ulcus (42). Schließlich wurde der Hund der Familie, ein asymptomatisch nasal kolonisierter Träger, als Quelle für die immer wieder auftretenden Infektionen identifiziert. Auch Oughton et al. (18) zeigen verschiedene Fälle von möglichen Übertragungen von MRSA zwischen Tierbesitzern und Haustieren auf. So wurde ein Jahr nach dem Krankenhausaufenthalt eines Hundebesitzers bei seinem Tier nach einer Operation der gleiche MRSA-Stamm festgestellt, an dem auch der Besitzer Monate zuvor schon erkrankt war. In einem zweiten Fall konnte eine MRSA-bedingte Otitis bei einem Hund auf den Kontakt zu einem ebenfalls infizierten Menschen zurückgeführt werden. In einem

weiteren Fall von postoperativer Wundinfektion bei einem Pferd konnte der Besitzer als Träger des gleichen MRSA-Stammes identifiziert werden (18).

Das Auftreten von nosokomialen Infektionen durch MRSA in einer Universitätsklinik für Pferdeheilkunde wurde erst kürzlich beschrieben, hier wird erstmals die Transmission von MRSA zwischen kolonisiertem Personal und Pferden durch Nachweis des identischen Genotyps belegt (60). Im Gegensatz dazu zeigen die Daten in einem anderen Fall, dass fünf MRSA-Genotypen bei Pferden aufgetreten sind, die bei dem entsprechenden betreuenden Personal nicht nachweisbar waren (124). Diese kurze Zusammenfassung einiger publizierter Daten belegt, dass MRSA zunehmend isoliert werden, die genannten Widersprüche machen aber auch deutlich, dass die Epidemiologie nicht verstanden ist.

2.6 Behandlung von MRSA-infizierten Tieren

Die Behandlung von MRSA-infizierten Tieren sollte grundsätzlich verschiedene Aspekte beinhalten. Nach der eindeutigen Diagnose der Spezies (*S. aureus*) und dem sicheren Nachweis der Methicillinresistenz (83; 102; 123) durch erfahrene und gut geschultes Personal in einem mikrobiologischen Labor sollte das betreffende Tier zunächst möglichst räumlich isoliert werden. Im Falle eines stationären Aufenthaltes in einem Stall bzw. einer Box oder einem Käfig sollte ein gut lesbares Schild mit einer Warnung angebracht werden, damit nicht aus Unachtsamkeit beim Füttern oder bei Pflege- und Behandlungsmaßnahmen MRSA-kontaminierte Hände und Gegenstände die Infektionserreger weiterverbreiten.

Das Personal muss stets gut informiert sein und in die zu ergreifenden Hygienemaßnahmen, insbesondere die Händehygiene, gründlich eingewiesen werden. Außerdem empfiehlt sich die Anbringungen eines Händedesinfektionsmittelspenders in unmittelbarer Nähe des Patienten. Kontaktpersonen (Ärzte, Pfleger usw.) sollten einen Kittel tragen, der nur bei der Arbeit mit dem betroffenen Tier getragen wird und im gleichen Raum verbleibt. Wundbehandlungen sind niemals mit bloßen Händen und unter Beachtung einer hygienischen Arbeitsweise (saubere Hilfsmittel, saubere Unterlagen/Tische, die Vorbereitung des Verbandsmaterials etc.) vorzunehmen.

Auch die Besitzer eines an MRSA erkrankten Tieres sollten über die Infektion ihres Tieres und deren zoonotisches Potential informiert werden, eingeschlossen Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit ihrem Tier bis zu dessen vollständiger Genesung.

2.7 Epidemiologie von MRSA

Begriffsbestimmung: Sporadisches Auftreten oder MRSA-Ausbruch

Bei dem Auftreten von MRSA-Isolaten im klinischen bzw. intensivmedizinischen Bereich gilt es zunächst zu ermitteln, ob eine sporadische MRSA-Infektion oder ein MRSA-Ausbruch vorliegt. Eine sporadische MRSA-Infektion ist definiert als Infektion nicht epidemischen Ursprungs, sie entsteht z.T. durch Autoinfektion (nasale Kolonisation des Patienten) oder andere Kontakte (90% der MRSA werden durch ungewaschene Hände verbreitet) und breitet sich in einer Institution (Krankenhaus) weder zeitlich noch räumlich aus (1).

Ein MRSA-Ausbruch hingegen ist gekennzeichnet durch das gehäufte Auftreten nosokomialer Infektionen (z.B. MRSA-Infektionen), bei denen ein epidemiologischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder vermutet wird (§6 Absatz 3 IfSG). Die Makrorestriktionsmuster-Analyse nach der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist nach wie vor das Mittel der Wahl bei der vergleichenden Untersuchung von MRSA-Isolaten einer Institution. Tritt ein PFGE-Muster bei verschiedenen Isolaten dieser Einrichtung in engem zeitlichen Zusammenhang immer wieder auf, so spricht man diesen Stamm als

Ausbruchsstamm an. Unter Umständen kann die Ursache der MRSA-Ausbreitung (mangelhafte Handreinigung und -desinfektion, ungeschultes Personal, unzureichende Geräewartung, usw.) durch diese PFGE-Analyse ermittelt und beseitigt werden (1).

Einsatz der Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST) in der Epidemiologie

Mit der Methode der Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST) wird durch die DNS-Sequenzanalyse von sieben definierten Haushalts-Genen die Verwandtschaft einer Vielzahl der weltweit isolierten MRSA (und MSSA) ermittelt. Diese sieben Gene kodieren wichtige Stoffwechsel-Eigenschaften des Bakteriums und werden eher konservativ vererbt (119). Mittels PCR wird jeweils ein definierter Abschnitt des jeweiligen Gens amplifiziert und anschließend doppelsträngig sequenzanalysiert. Eine Online-Datenbank der University of Bath (www.mlst.net), ermöglicht die Zuordnung der Gensequenzen zu einzelnen Alleltypen, die mit arabischen Ziffern gekennzeichnet sind. Aus den sieben Alleltypen setzt sich der Sequenztyp (ST) zusammen, der im Vergleich zu anderen MRSA-Sequenztypen eine genetische Einordnung in mehr oder weniger verwandte Linien erlaubt. Auf diese Weise kann auch der MSSA-Genotyp, der dem MRSA-Genotyp zugrunde liegt, ermittelt werden.

Diese Methode eignet sich gut für langfristige Analysen und die Aufklärung von epidemiologischen Entwicklungen weltweit. Für Ausbruchsuntersuchungen in einer Institution ist die MLST hingegen der PFGE und der *Spa*-Typisierung in ihrer Aussagekraft unterlegen, da sie weniger diskriminativ analysiert (1). Für die Feststellung von "humanen" MRSA-Genotyplinien bei Tieren ist bis zur hinreichenden Aufklärung derer epidemiologischer Bedeutung jedoch eine Analyse mittels MLST, *Spa*-Typisierung, sowie PFGE unverzichtbar.

Einsatz der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) in der Epidemiologie

Durch Makrorestriktion wird das gesamte Genom von *S. aureus* mit einem Enzym, der Endonuklease *Sma*I, an bekannten Schnittstellen in ca. 15 - 16 Fragmente geschnitten. Diese Fragmente lassen sich durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) in einem elektrischen Feld auftrennen, wobei kleinere DNS-Stücke das halb feste Medium (PFGE-Gel) schneller durchwandern als große Fragmente. Die nach Färbung und unter UV-Licht darstellbaren Bandenmuster entsprechen dem "genetischen Fingerabdruck" des jeweiligen Bakteriums. Die vergleichende Analyse der Bandenmuster von Isolaten einer Institution erlauben epidemiologische Schlussfolgerungen, insbesondere im Hinblick auf das Vorliegen einer Ausbruchssituation. Die PFGE-Methode hat eine sehr hohe Reproduzierbarkeit und Fähigkeit zu Diskriminierung (1).

Typisierung der polymorphen Region X des Proteins A von *S. aureus* (*Spa*-Typing)

Aus dem Bemühen um die Entwicklung einer schnellen und dennoch gut diskriminierenden genbasierten Methode für die Surveillance von MRSA in medizinischen Einrichtungen ist die Entwicklung der *Spa*-Typisierung erwachsen. Zunächst entwickelten Frenay et al. (30) eine Single-Locus-Typisierungsmethode für *S. aureus* auf der Basis der polymorphen Region X in dem Gen *spa*, welches für das zellwandassoziierte Protein A codiert. Durch die guten diskriminierenden Resultate dieser Methode, die durch Anwendung einer Kalkulation mit Simpson's Diversitäts-Index (30) belegt werden konnte, hat die *Spa*-Typisierung Verbreitung als Typisierungsverfahren für MRSA im klinischen Alltag gefunden.

Die DNS-Sequenz der Amplifikate wird durch Analyse ermittelt. Die Anzahl der auftretenden Wiederholungssequenzen (Repeats) schwankt zwischen 1 und 20. Durch visuellen oder automatischen Abgleich der Sequenzen mit einer Datenbank kann der *Spa*-Typ bestimmt werden. Die Benennung der *Spa*-Typen erfolgt auf alpha-numerischer Grundlage (72).

Typisierung der chromosomalen Staphylokokken Genkassette: SCC_{mec}-typing

Der *mec*-Komplex, welcher das *mecA*-Gen enthält, unterliegt einer gewissen Variabilität (93). Die bislang beschriebenen fünf verschiedenen *mec*-Regionen (A-E) werden durch die genetische Komposition von Insertionssequenzen und Regulatorgene definiert. Eine aktuelle anschauliche Übersicht der bislang bekannten Varianten dieser Komplexe findet sich bei Shore et al. (85).

Punktmutationen in der Promotorregion des *mecA*-Gens scheinen bei der Stärke der Resistenzausbildung eine größere Bedeutung zu haben als Mutationen in *mecI* oder *mecA* (106). Bislang wurden fünf SCC_{mec}-Typen (SCC_{mec} I-V) (81; 92; 97) sowie diverse genetische Varianten innerhalb dieser Typen beschrieben, die Einteilung erfolgt aufgrund des vorliegenden *mec*-Komplexes sowie der vorhandenen Rekombinase-Gene, Varianten können durch die Typisierung der J-Regionen definiert werden (85).

Die Staphylokokken-Genkassette SCC ist als mobiles Element auch in KNS weit verbreitet und nicht immer mit einem *mec*-Komplex verbunden. Vielmehr scheint SCC ein genetisches Austauschsystem für Staphylokokken zu sein (81).

Derzeit geht man davon aus, dass *S. aureus* das *mecA*-Gen ursprünglich durch horizontalen Genaustausch von einer entfernt verwandten Spezies erworben hat, so könnte *S. sciuri* das *mecA*-Gen erstmalig adaptiert haben (119).

Da *S. aureus* die SCC_{mec}-Elemente akquirieren oder verlieren können, bietet die genetische Analyse der *mec*-Region eine gute Ergänzung bei der verwandtschaftlichen Zuordnung, denn diese Region ist genetisch hoch konserviert (94).

Der gewebetoxische Faktor Panton-Valentine Leukozidin (PVL)

Panton-Valentine Leukozidin (PVL) ist ein zytotoxischer Faktor, der Leukozyten zerstört und zur Gewebsnekrose führt. Dieses Exotoxin wird von weniger als 5% aller *S. aureus*-Stämme produziert. PVL-Gene (*lukS*-PV, und *lukF*-PV) werden hauptsächlich in Verbindung mit Furunkulosis und nekrotisierenden Pneumonien, aber auch bei Abszessen und vereinzelt bei osteomyelitischen Prozessen beobachtet (82).

Die PVL-Gene werden häufig in Zusammenhang mit community-acquired (ca-) MRSA genannt (105; 107). Aber auch bei von Tieren stammenden MRSA ist dieser Faktor bereits nachweislich aufgetreten (37).

Häufig wird der Nachweis dieser Gene neben anderen charakteristischen Eigenschaften zur Typisierung von MRSA herangezogen (107).

Fragestellungen zu MRSA-ST: Beurteilungskriterien und Populationsmodell Minimum Spanning Tree (MST)

Die Erbinformation der Bakterien ist wie die aller Lebewesen in der DNS gespeichert. Die einzelnen Gene dieser DNS sind zusammengesetzt aus einer Abfolge von Nukleotiden, die die Bauanleitung für alle Lebensbausteine enthalten. Die häufig auftretenden Redundanzen dieses Kodes führen dazu, dass genetische Änderungen der Nukleotide nicht in jedem Fall zu einer für das einzelne Lebewesen auffälligen Mutation führen (sog. "stille" Mutationen). Alle

genetischen Änderungen, die die Summe der Erbinformationen nicht schwer beeinträchtigen oder sogar verbessern, werden im Laufe der Evolution im Genom akkumuliert. Durch die molekulargenetische Analyse dieser Sequenzdivergenzen können Rückschlüsse im Hinblick auf die Phylogenie der betreffenden Bakterien-Populationen gezogen werden.

Die MRSA-Genotypen aus dieser Arbeit sollen unter zwei Gesichtspunkten beurteilt werden. Zunächst muss die Frage gestellt werden, ob die hier beschriebenen ST von Tieren auch bei Menschen schon beschrieben worden sind, insbesondere in klinischen Zusammenhängen. Ein weiterer Gesichtspunkt ist der Grad der genetischen Verwandtschaft. Sind alle MRSA bei Tieren Abkömmlinge einer Genotyplinie oder gar eines Genotyps, die sich besonders leicht an die Gegebenheiten bei Tieren oder vielleicht auch nur bei einzelnen Spezies anpassen konnten? Oder haben animale Genotypllinien, die bislang bei Menschen kaum isoliert wurden, unabhängig von der MRSA-Entwicklungsgeschichte in der Humanmedizin die resistenzvermittelnden Gene adaptiert? Bedacht werden sollte auch, dass beide Möglichkeiten auch gleichermaßen zutreffen könnten.

Während einige dieser Fragen durch den Abgleich eigener Ergebnisse mit der Literatur und der Online-Datenbank www.mlst.net (Stand September 2006) ermöglicht werden, ist für die Aufklärung der genetischen Verwandtschaftsgrade und Einordnung der STen in ein Populationsmodell ein sog. Minimum Spanning Tree (MST) ("minimal spannender Baum") entworfen worden (74). Dieses topologische Verfahren aus der Mathematik beruht vom Grundsatz her auf einer gegebenen Anordnung von Punkten. Zunächst werden die Abstände aller Punkte zu allen anderen Punkten berechnet. Diese Distanzen dienen anschließend der Ermittlung der geringsten Wegstrecken, die so verbunden werden sollen, dass die Summe der Distanzen (Äste) des auf diese Weise entstehenden Baumes minimiert werden.

Es soll an dieser Stelle nicht verschwiegen werden, dass es auch andere Modelle für die Darstellung evolutionärer Zusammenhänge gibt, die hier nicht berücksichtigt werden.