

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Zelluläre Invasivität und molekulare Marker von
kolonisierenden und Infektions-assoziierten
Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Isolaten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Matthias Eduard Raspe

aus Hannover

Würzburg, Juni 2011

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bhanu Sinha

Koreferent: Prof. Dr. med. Johannes G. Liese

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2012

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinischer Hintergrund	1
1.2	Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> und ihre Regulation	5
1.2.1	Hämolyse	6
1.2.2	Plasmin-sensitives Protein.....	7
1.2.3	Protein A und <i>spa</i> -Typisierung.....	8
1.2.4	Accessory gene regulator (Agr)	10
1.2.5	Methicillin-Resistenz	13
1.3	Fakultativ intrazellulärer <i>S. aureus</i> und mögliche klinische Relevanz	15
2	Problemstellung und Zielsetzung	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Herkunft der Bakterien	20
3.1.1	Anlegen einer Übernachtskultur	21
3.1.2	Einfrieren und Auftauen der Bakterien.....	21
3.2	Kultur der 293-Zellen	22
3.2.1	Material und Hersteller.....	22
3.2.2	Auftauen der Zellen	22
3.2.3	Passage der Zellen.....	23
3.3	Invasions-Test	23
3.3.1	Material und Hersteller.....	24
3.3.2	Vorbereitung der Zellen	24
3.3.3	Vorbereitung der Bakterien.....	25
3.3.4	Vorbereitung von Zellen und Bakterien.....	26

3.4	Durchflusszytometrie	27
3.5	Isolierung chromosomaler DNA	28
3.5.1	Material und Hersteller.....	28
3.5.2	Durchführung.....	28
3.6	Messung und Einstellung der DNA-Konzentration	29
3.7	Gelelektrophorese und Auswertung	29
3.7.1	Material und Hersteller.....	29
3.7.2	Herstellung eines 1,5% Agarosegels.....	30
3.7.3	Elektrophorese des PCR-Produkts.....	30
3.7.4	Ethidiumbromid-Färbung und Dokumentation	30
3.8	SCC<i>mec</i>-Typisierung.....	30
3.8.1	Material und Hersteller.....	30
3.8.2	Durchführung.....	31
3.9	<i>p/s</i>-PCR	31
3.9.1	Material und Hersteller.....	32
3.9.2	Durchführung.....	32
3.10	<i>agr</i>-Typisierung.....	32
3.10.1	Material und Hersteller.....	33
3.10.2	Durchführung.....	33
3.11	<i>mecA</i>-PCR	33
3.12	<i>spa</i>-Typisierung	34
3.13	Based Upon Repeat Pattern (BURP)-Analyse	34
3.14	Bestimmung der Hämolyseform.....	35
3.15	Geräte.....	35

3.16	Statistische Auswertung	36
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Prävalenz von <i>S. aureus</i> und MRSA.....	38
4.2	SCC positive, <i>mecA</i> negative Isolate	39
4.3	Molekulare Charakterisierung der Studienstämme.....	42
4.4	Based Upon Repeat Pattern (BURP)-Analyse	45
4.5	β -Hämolyse und zelluläre Invasivität	47
4.6	Molekulare Marker korrelieren mit zellulärer Invasivität.....	50
4.7	Die Etablierung einer Infektion ist unabhängig von der zellulären Invasivität	53
4.8	Die Etablierung einer Infektion ist unabhängig vom <i>spa</i> - und <i>agr</i> -Typ.....	56
5	Diskussion	58
6	Zusammenfassung.....	65
7	Anhang.....	66
8	Literaturverzeichnis	68

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.	Schematische Darstellung der <i>spa</i> -Typisierung	9
Abbildung 2.	Genregulation von <i>S. aureus</i>	10
Abbildung 3.	Funktionsweise des <i>agr</i> -Genregulators	12
Abbildung 4.	Schematische Darstellung verschiedener SCC <i>mec</i> -Typen	14
Abbildung 5.	Modell des Invasionsmechanismus von <i>S. aureus</i>	17
Abbildung 6.	Flussdiagramm zur Analyse der Studienisolate.....	39
Abbildung 7.	Vergleich der <i>spa</i> -Typ-Verteilung von MRSA- und SCC ⁺ / <i>mecA</i> ⁻ -Studienisolaten.....	40
Abbildung 8.	<i>spa</i> -Typ-Verteilung der MRSA-Studienisolate	42
Abbildung 9.	SCC <i>mec</i> -Typ-Verteilung der MRSA-Studienisolate.....	43
Abbildung 10.	<i>agr</i> -Typ-Verteilung der MRSA-Studienisolate.....	44
Abbildung 11.	Populationsstruktur aller <i>S. aureus</i> -Studienisolate	45
Abbildung 12.	Verschiedene Ausprägungen der β -Hämolyse	47
Abbildung 13.	β -Hämolyse und zelluläre Invasivität	48
Abbildung 14.	Molekulare Marker und zelluläre Invasivität.....	51
Abbildung 15.	Kolonisierer, Infektions-assoziierte Isolate und zelluläre Invasivität	55
Tabelle 1.	Prävalenz von MRSA und <i>S. aureus</i> im Studienzeitraum	38
Tabelle 2.	Vergleich der <i>spa</i> -Typ-Verteilung von SCC ⁺ / <i>mecA</i> ⁻ - und MRSA-Isolaten	41
Tabelle 3.	Klinische Informationen zu den Infektions-assoziierten Isolaten.....	53
Tabelle 4.	Vergleich der Häufigkeit von <i>spa</i> - und <i>agr</i> -Typen unter kolonisierenden und Infektions-assoziierten MRSA	56
Tabelle 5.	Zusammenstellung molekularer Charakteristika aller Studienisolate (außer MSSA des Kontrollzeitraums).	66

Abkürzungsverzeichnis

ACME	arginine catabolic mobile element
<i>agr</i> , Agr	accessory gene regulator (Gen, Regulator)
AIP	autoinducing peptide
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare (base pairs)
BURP	based upon repeat pattern
CA-MRSA	community-associated MRSA
CC	Clonal Complex
<i>ccr</i>	cassette chromosome recombinase, Gen
CifA/ B	clumping factor A/ B
CnA	collagen adhesin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Eap	extracellular adherence protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
Fn	Fibronectin
FnBP	Fibronectin-bindendes Protein
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
HA-MRSA	hospital-associated MRSA
<i>hla</i>	Hämolysin-Gen a
<i>hly</i>	Hämolysin-Gen b
HSA	humanes Serumalbumin
IE	infektiöse Endokarditis

IgG	Immunglobulin G
IU	Internationale Einheiten (international units)
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM	Mol, Millimol
<i>mecA</i>	methicillin resistance A, Gen
MHB	Müller-Hinton-Bouillon
min, s, ms	Minuten, Sekunden, Millisekunden
MLST	Multilocus-Sequenz-Typisierung (multilocus sequence typing)
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
ND	nicht durchgeführt (not done)
NT	nicht typisierbar (non-typeable)
OM	Osteomyelitis
<i>orfX</i>	open reading frame X, Gen
ORSA	Oxacillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PBS	phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
<i>pIs</i> , Pls	Plasmin-sensitives Protein (Gen, Protein)
PSM	phenol-soluble modulin
PVL	Panton-Valentin-Leukozidin
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. fleurettii</i>	<i>Staphylococcus fleurettii</i>
<i>S. sciuri</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SERAM	secretable expanded repertoire adhesive molecules

SCC <i>mec</i>	staphylococcal chromosomal cassette <i>mec</i>
SCV	small colony variant
<i>spa</i> , SpA	staphylococcal protein A (Gen, Protein)
SSSS	staphylococcal scalded skin syndrome
ST	Sequenztyp (sequence type)
TSS	Toxisches Schocksyndrom
TSST-1	Toxisches Schocksyndrom Toxin-1
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WTA	Zellwandteichonsäuren (wall teichonic acid)

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Staphylokokken sind Gram-positive, bei Menschen und Tieren als Besiedler (sogenannte Kolonisierer) von Haut und Schleimhäuten weit verbreitete Bakterien. Sie treten aufgrund ihrer Unbeweglichkeit meist in Traubenform oder dichten Haufen auf (aus dem Griechischen: *staphylé*, Weintraube; *kókkos*, Kern oder Korn), bilden keine Sporen, sind katalasepositiv und (mit seltenen Ausnahmen [1]) fakultativ anaerob. Klinisch ist eine Unterscheidung der Staphylokokken in koagulasepositive und koagulasenegative Spezies von Bedeutung. Der Hauptvertreter der koagulasenegativen Staphylokokken ist *Staphylococcus epidermidis*, ein Bakterium, das als Verursacher von Katheter-assoziierten nosokomialen Infektionen große klinische Bedeutung hat. Hauptvertreter der koagulasepositiven Staphylokokken ist *Staphylococcus aureus*. Er weist die höchste pathogene Potenz unter den Staphylokokken auf [2, 3].

Die Pathogenität von *Staphylococcus aureus* spiegelt sich in einer großen Anzahl von zellwandständigen und in die Umgebung abgegebenen Virulenzfaktoren wieder (siehe Kapitel 1.2).

Als Kolonisierer ist *S. aureus* bei den Menschen weit verbreitet. Etwa 20% der Menschen (Bereich von 12% bis 30%) sind dauerhafte nasale Träger von *S. aureus*, etwa 30% (Bereich von 16% bis 70%) sind vorübergehend kolonisiert, dagegen sind 50% der Menschen (Bereich von 16% bis 69%) keine Träger von *S. aureus* [4]. Bedeutendster Ort einer Kolonisation durch *S. aureus* sind die Nasenvorhöfe [5], gefolgt von Haut, Perineum und Rachen [5-7]. Weitere weniger häufige Prädilektionsstellen sind Gastrointestinaltrakt [5, 8], Vagina [9] und Axilla [5, 7, 10].

Die Kolonisation durch *S. aureus* ist in der Regel asymptomatisch und *S. aureus* verursacht bei immunkompetenten Menschen gewöhnlich keine Infektionen. Ist allerdings das Immunsystem geschwächt, oder die Barrierefunktion der Haut/ Schleimhaut am Ort der Kolonisation herabgesetzt,

kann *S. aureus* eine Vielzahl an unterschiedlichen Erkrankungen hervorrufen. So stellt unter anderem für Patienten nach chirurgischen Eingriffen und solche, die sich regelmäßig einer Hämo- oder Peritonealdialyse unterziehen müssen, sowie für HIV-infizierte die Kolonisation durch *S. aureus* einen Risikofaktor für eine Infektion dar [11].

Das Spektrum der durch *S. aureus* hervorgerufenen Erkrankungen reicht von lokalisierten oder generalisierten pyogenen Infektionen, wie beispielsweise Furunkel, Karbunkel, Abszess, Wundinfektion, Pneumonie, Endokarditis, Osteomyelitis und Sepsis, bis zu Toxin-vermittelten Erkrankungen wie das staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS), das Toxische Schocksyndrom (TSS) und die Lebensmittelintoxikation.

Die antibiotische Therapie von *S. aureus* wurde in den letzten Jahrzehnten durch das Auftreten von Resistenzen erheblich erschwert. Wenige Jahre nach Einführung des ersten Penicillins wurden bereits 1944 erste Penicillin-resistente *S. aureus*-Stämme beschrieben [12]. Die Anzahl der Penicillinase-produzierenden Stämme wuchs rasant. Penicillinasen sind β -Lactamasen, die den β -Lactam-Ring des Penicillins hydrolytisch spalten und das Antibiotikum somit unwirksam machen. Heute sind etwa 80% der Stämme resistent gegen Penicillin G. Als Antwort auf Penicillinase produzierende *S. aureus*-Stämme wurde 1960 mit dem Präparat Methicillin das erste penicillinasefeste Penicillin eingeführt. Methicillin ist nicht mehr im Handel. Heute werden u.a. die Präparate Oxacillin und Flucloxacillin verwendet, deshalb wird statt von Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolaten (MRSA) auch von Oxacillin-resistenten *S. aureus*-Isolaten (ORSA) gesprochen. Doch auch hier wurden bereits innerhalb eines Jahres nach Einführung erste Resistenzen beobachtet [13, 14]. Für die Resistenz gegenüber Methicillin ist das *mecA*-Gen verantwortlich, das für ein verändertes Penicillin-bindendes Protein (PBP2a) kodiert. Die β -Lactam-Antibiotika können durch eine deutlich verringerte Affinität zu den veränderten Penicillin-bindenden Proteinen ihre Wirkung kaum mehr entfalten (für Details siehe Kapitel 1.2.5).

Bis zu den 90er-Jahren blieben die Resistenzraten in Deutschland relativ niedrig. Zwischen 1990 und 2001 erhöhte sich die MRSA-Rate allerdings

deutlich von <2% auf >20% [15]. 2009 waren in Deutschland 18,5% der *S. aureus*-Isolate aus Blutkulturen Methicillin-resistent. Verglichen mit seinen europäischen Nachbarn nimmt Deutschland damit eine Position im oberen Mittelfeld ein. Die niedrigsten MRSA-Raten weisen die Niederlande und die skandinavischen Länder mit weniger als 2,1% auf, die höchsten MRSA-Raten werden aus Italien, Griechenland, Portugal und Malta gemeldet (37,4% bis 58,1%) [16]. Insgesamt zeigen sich die MRSA-Raten in den europäischen Ländern aufgrund intensiver infektionsepidemiologischer Maßnahmen momentan stabil bis leicht rückläufig. Die hochgerechnete Anzahl an nosokomial erworbenen MRSA-Infektionen betrug in Deutschland laut Robert-Koch-Institut im Jahr 2008 ca. 34.000 Fälle [17].

Neben dem *mecA*-Gen können *S. aureus*-Stämme auch eine Vielzahl weiterer Gene auf dem Chromosom oder Plasmiden tragen, die für eine Resistenz gegenüber Antibiotikagruppen wie Kanamycine (gehören zu den Aminoglycosid-Antibiotika), Tetracycline, Makrolide, Lincosamide (u.a. Clindamycin) und andere kodieren [18].

Zur Therapie von MRSA galt viele Jahre das Reserveantibiotikum Vancomycin (ein Glykopeptid-Antibiotikum) als erste Wahl. Im Jahr 2002 wurde in den USA erstmalig ein Vancomycin-resistenter *S. aureus*-Stamm isoliert [19]. Die Vancomycin-Resistenz wurde durch *S. aureus* von resistenten *Enterococcus faecalis*- Stämmen erworben [20].

Als weitere Reserveantibiotika stehen heute unter anderem Substanzen wie Linezolid (ein Oxazolidinon, für das auch bereits resistente *S. aureus*-Stämme beschrieben wurden), Daptomycin (aus der Klasse der zyklischen Lipopeptide) und Tigecyclin (aus der Klasse der Glycylcycline) zur Verfügung.

Seit ihrem ersten Auftreten waren MRSA typischerweise mit Krankenhäusern und im Besonderen mit Intensivstationen assoziiert (sogenannte HA-/ hospital-associated-MRSA). Eine wachsende Sorge bereitet das zunehmende Auftreten von sogenannten CA-/ community-associated-MRSA über die letzten 20 Jahre (CA-MRSA sind im Gegensatz zu HA-MRSA epidemiologisch dadurch definiert, dass sie innerhalb von 48 Stunden nach Aufnahme des Patienten in ein

Krankenhaus, oder außerhalb des Krankenhauses vom Patienten isoliert werden [18]).

CA-MRSA-Stämme sind auf genetischer Ebene verschieden zu HA-MRSA. Sie tragen häufig die kleinen und mobileren *SCCmec*-Kassetten der Typen IV und V, im Gegensatz zu HA-MRSA, die eher mit den Typen I, II und III assoziiert sind [18] (Details zu *SCCmec* siehe Kapitel 1.2.5).

Erfreulicherweise sind CA-MRSA im Gegensatz zu HA-MRSA häufig noch sensibel gegenüber nicht- β -Lactam-Antibiotika [21].

Auch klinisch unterscheiden sich HA-MRSA- und CA-MRSA-assoziierte Infektionen. CA-MRSA sind (besonders in der USA) häufig positiv für das Panton-Valentin-Leukozidin (PVL; ein aus zwei Komponenten bestehendes, porenbildendes Toxin, das zu einem hohen Prozentsatz mit *SCCmec* Typ IV und V vorkommt), das mit tiefgehenden und rezidivierenden Hautinfektionen (wie Abszesse und Furunkeln) und einer lebensbedrohlichen nekrotisierenden Pneumonie einhergehen kann [22]. CA-MRSA verursachen zudem häufig Infektionen bei jungen und gesunden Menschen ohne typische Risikofaktoren, wie sie bei HA-MRSA bekannt sind [23].

Durch den Transfer von CA-MRSA in die Krankenhäuser und umgekehrt beginnen die Unterscheidungsmerkmale von HA- und CA-MRSA in zunehmenden Maße zu verschwimmen, so dass eine Differenzierung durch beispielsweise die *SCCmec*-Typisierung nicht mehr zuverlässig ist [18].

Viele Studien sind der Frage nachgegangen, ob MRSA klinisch virulenter sind als Methicillin-sensible *S. aureus*-Stämme (MSSA). Bislang sind die Ergebnisse widersprüchlich und deuten in der Zusammenschau nicht auf eine erhöhte Morbidität oder Letalität von MRSA-Infektionen im Vergleich zu MSSA-Infektionen hin. Allerdings ist die Therapie von MRSA-Infektionen kostspieliger und hinsichtlich therapeutischer Optionen limitiert [21].

1.2 Virulenzfaktoren von *S. aureus* und ihre Regulation

Die Pathogenität von *S. aureus* spiegelt sich in einer Vielzahl von zellwandgebundenen und löslichen, in die Umgebung abgegebenen Virulenzfaktoren wider. Für die Adhäsion von *S. aureus* sind im Besonderen Proteine der MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)- [24, 25] und der SERAM (secretable expanded repertoire adhesive molecules)- [26] Klassen von Bedeutung. Zur Klasse der MSCRAMM gehören zellwandständige Proteine wie der Verklumpungsfaktor (ClfA/ B), das Protein A (SpA, siehe Kapitel 1.2.3), Fibronektin bindende Proteine (FnBPA/ B, siehe Kapitel 1.3) und Kollagen bindende Proteine (Cna), die die Adhäsion an Wirtsgewebe vermitteln. Proteine der SERAM-Klasse wie das Eap (extracellular adherence protein) haben eine ähnliche Funktion, sind aber nicht an die Zellwand gebunden. Das Potential zur Adhäsion von *S. aureus* wird des Weiteren auch durch das Plasmin-sensitive Protein (Pls) moduliert, das der Klasse der MSCRAMMs zuzuordnen ist (siehe Kapitel 1.2.2).

S. aureus ist in der Lage, eine Polysaccharid-Kapsel zu bilden, die das Bakterium zusätzlich schützt. Am häufigsten sind die Kapseltypen 5 [27] und 8. Die Persistenz von *S. aureus* im Wirt (im Besonderen an Fremdkörpern) wird darüber hinaus durch die Bildung von Biofilm begünstigt.

S. aureus ist in der Lage eine große Anzahl an verschiedenen Enzymen und Toxinen zu produzieren, die im Falle einer Infektion den Wirt schädigen [21, 27]. Zu den Enzymen zählen Proteinasen, Lipasen, Hyaluronidasen und viele mehr, die Gewebe zerstören können und das Eindringen des Bakteriums in Gewebe begünstigen. Die β -Laktamase inaktiviert Penicillin G (siehe Kapitel 1.1). Die Koagulase, ein Prothrombinaktivator, katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Zu den Toxinen zählen u.a. porenbildende Zytotoxine wie Hämolsine und das Panton-Valentin-Leukozidin (siehe Kapitel 1.1), exfoliative Toxine, die das staphylococcal scalded skin syndrome hervorrufen, das TSST-1 (Toxisches Schocksyndrom Toxin-1), das als Superantigen das Toxische Schocksyndrom (TSS) auslösen kann und Enterotoxine, die für Lebensmittelintoxikationen verantwortlich sind und ebenfalls als Superantigene wirken können.

Die Regulation der Virulenzfaktoren erfolgt durch eine Anzahl von verschiedenen, komplexen Genregulatoren. Am besten untersucht wurde der *agr* (accessory gene regulator)-Regulator. Weitere Regulatoren sind SigB, *sar*, ArlR/ S, SaeRS, Rot, *mgr* [21] und andere.

Im Folgenden werden diejenigen Virulenzfaktoren bzw. Regulatoren detaillierter dargestellt, die relevant für die vorliegende Arbeit sind.

1.2.1 Hämolsine

Bisher sind vier von *S. aureus* produzierte Hämolsine, das α -, β -, γ - und δ -Hämolsin, beschrieben worden. Die Hämolsine werden einzeln oder in Kombination von *S. aureus* produziert. Dies führt zu unterschiedlich ausgeprägten Hämolyseformen (bei einer doppelten Hämolyse werden meist das α - und β -Hämolsin zeitgleich exprimiert, wobei das β -Hämolsin üblicherweise den äußeren Lysehof bildet).

Das α -Hämolsin ist das am intensivsten untersuchte aller Hämolsine. Es ist ein porenbildendes Toxin, das von der Mehrheit aller *S. aureus*-Isolate gebildet wird. Kodiert wird das 33 kDa große α -Hämolsin durch das *hla*-Gen. Das α -Hämolsin ist gegen eine Vielzahl von menschlichen Zellen wirksam und klinisch im Besonderen mit Pneumonie, Sepsis, septischer Arthritis, Hirnabszess und Infektionen der Kornea assoziiert. Neben seiner Eigenschaft Poren zu bilden induziert das α -Hämolsin auch die Sekretion von Zyto- und Chemokinen. Erwähnenswert ist auch die besonders ausgeprägte hämolytische Eigenschaft gegenüber Kaninchen-Erythrozyten [28].

Das β -Hämolsin ist eine 35 kDa große Sphingomyelinase, die durch das *hlyB*-Gen kodiert wird. Das β -Hämolsin ist besonders wirksam gegenüber Erythrozyten aus Schafsblut. Die hämolytische Aktivität des β -Hämolsin wird durch Temperaturen unter 10°C gesteigert. Klinisch ist das β -Hämolsin besonders durch eine Assoziation mit Infektionen der Lunge und der Kornea gekennzeichnet [28].

Das γ -Hämolsin ist ein aus zwei Komponenten bestehendes Toxin, das nahezu von jedem *S. aureus*-Stamm produziert wird. Das γ -Hämolsin ist in der Lage, eine Vielzahl von menschlichen Zellen zu zerstören. Auf Schafblutagar

können γ -Hämolysin produzierende Stämme kaum identifiziert werden, da die Aktivität durch Bestandteile des Agars inhibiert wird [29].

Das δ -Hämolysin ist ein 26 Aminosäuren großes zytolytisches Peptid, das zur Gruppe der PSMs (phenol-soluble modulins), einer Klasse wichtiger Virulenzfaktoren, deren Rolle zurzeit in der Diskussion steht, gerechnet wird [30]. Es wird auf der Effektor-RNAIII des *agr*-Genregulators kodiert [31, 32] (siehe Kapitel 1.2.4) und somit durch diesen reguliert. 97% aller *S. aureus*-Isolate produzieren das δ -Hämolysin. Es ist in der Lage, Erythrozyten und andere Zelltypen zu lysieren [28]. Kürzlich konnte die Bedeutung des δ -Hämolysin in Kombination mit dem β -Hämolysin für den Ausbruch von *S. aureus* aus Phagoendosomen von humanen Epithel- und Endothelzellen *in vitro* gezeigt werden [33].

S. aureus ist in der Lage neben den Hämolysinen eine Reihe weiterer Zytotoxine, wie beispielsweise das Panton-Valentin-Leukozidin (siehe Kapitel 1.1), zu exprimieren.

1.2.2 Plasmin-sensitives Protein

Das Plasmin-sensitive Protein (Pls) ist ein 230 kDa großes Protein, das zur Klasse der adhäsiven Oberflächenmoleküle (MSCRAMM) zu rechnen ist. Der Name leitet sich von der Eigenschaft dieses Proteins ab, sensitiv gegenüber einer Proteolyse durch Plasmin zu sein, das Pls in zwei Teile spaltet (ein 175 kDa- und ein 68 kDa-Fragment) [34]. Pls wurde erstmals bei MRSA beschrieben, die in *S. aureus*-Schnelltests auf den Verklumpungsfaktor und Protein A nicht reagierten [35]. Pls wird nur von Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolaten exprimiert und ist auf genetischer Ebene mit dem *mecA*-Gen assoziiert. Vermutlich wurde das *pls*-Gen durch *S. aureus* von der Staphylokokken-Spezies *S. sciuri* erworben [36]. Es ist vorzugsweise in der SCC*mec*-Kassette vom Typ I zu finden [37, 38], wurde aber auch kürzlich in einer SCC*mec*-Kassette vom Typ IV beschrieben [39]. Die Expression von Pls reduziert das adhäsive und invasive Potential von MRSA-Isolaten [38-40]. Als Mechanismus wurde eine sterische Inhibition gezeigt [41].

1.2.3 Protein A und *spa*-Typisierung

Das Protein A ist ein an die Oberfläche von *S. aureus* gebundenes Protein, das in der Lage ist Immunglobuline an ihrem Fc-Teil zu binden [42]. Durch umgekehrtes Binden des Immunglobulins (IgG) an das Bakterium kann der Fc-Teil nicht mehr als Ligand für Phagozyten wirken. Das Protein A ist als Virulenzfaktor zum Schutz des Bakteriums vor Opsonisierung und Phagozytose von großer Bedeutung. Des Weiteren vermag das Protein A den Von-Willebrand-Faktor (vWF) zu binden und könnte somit eine Bedeutung für die Pathogenese von endovaskulären Infektionen durch *S. aureus* haben [43]. Kodiert wird das Protein A durch das *spa*-Gen. Das *spa*-Gen setzt sich aus ca. 2150 Basenpaaren (bp) zusammen. Der N-terminale Teil des *spa*-Gens beherbergt fünf homologe Bindestellen für das Immunglobulin G (zu je 160 bp). In Richtung des C-terminalen Teils folgen die Region X und ein Teil, der für die Verankerung in der Zellwand verantwortlich ist [44]. Durch Fréney et al. wurde 1994 die Bedeutung der Region X als epidemiologischer Marker erkannt [45]. Die Region X ist ein hypervariabler DNA-Abschnitt, der in stabile DNA-Abschnitte eingebettet ist. Sie besteht aus einer variablen Länge von 2 bis 16 unterschiedlichen Wiederholungssequenzen (sogenannte Repeats), die wiederum aus einer bestimmten Anzahl an Basenpaaren (ca. 24 bp) zusammengesetzt sind. Mittlerweile sind über 467 unterschiedliche Repeats bekannt (Stand Juni 2011, <http://spaserver.ridom.de/>). Die charakteristische Anzahl und Reihenfolge an Repeats lässt eine Zuordnung zu exakt definierten Typen zu (Abb. 1). Die Nummerierung der Repeats erfolgt dabei entweder numerisch nach der Nomenklatur von Harmsen et al. [46], oder alphanumerisch nach der Nomenklatur von Kreiswirth et al. [47]. Für diese Arbeit wurde die weiter verbreitete Nomenklatur nach Harmsen et al. verwandt. Zur *spa*-Typisierung wird in der Praxis das *spa*-Gen automatisch sequenziert und die Sequenz mit einer kommerziellen Software analysiert. Im Internet steht eine Datenbank (<http://spaserver.ridom.de/>) bereit, in der alle Sequenzen gesammelt und harmonisiert werden können.

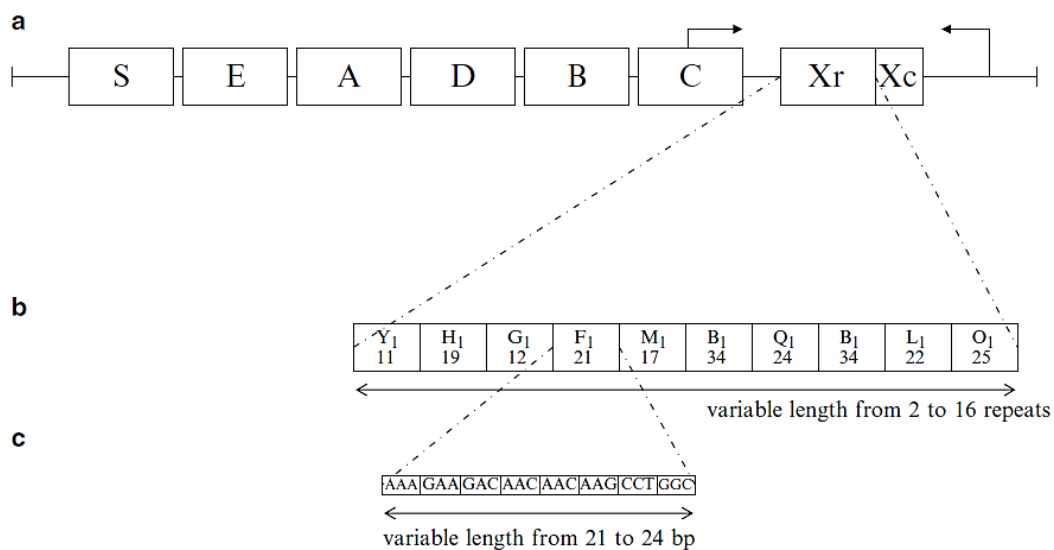


Abbildung 1. (a) Schematische Darstellung des *spa*-Gens. S ist eine Signalsequenz, E bis C sind die IgG-Bindungsstellen, Xr ist die hypervariable Region und Xc ist für die Bindung an die Zellwand von Bedeutung. Die Pfeile zeigen die Ansatzstellen der Primer für die *spa*-Typisierung. (b) Struktur der Region X, die aus einer variablen Anzahl und Kombination verschiedener Repeats besteht. Dargestellt wird *spa*-Typ t008 nach der Nomenklatur von Harmsen et al. oder *spa*-Typ YHGFMBQBLO nach der Kreiswirth-Nomenklatur. (c) Sequenz des Repeats 21 (nach Harmsen) bzw. F1 (nach Kreiswirth). Abbildung entnommen aus [44].

Die *spa*-Typisierung ist als schnelle, genaue und gut vergleichbare Methode zur Typisierung von *S. aureus*-Isolaten, neben den „Goldstandard“-Methoden wie PFGE (Pulsfeld-Gelelektrophorese) und MLST (multilocus sequence typing), mittlerweile gut etabliert [44].

Mit der BURP (Based Upon Repeat Pattern)-Analyse lässt sich, basierend auf der *spa*-Typisierung, die klonale Verwandtschaft von *S. aureus*-Isolaten ermitteln, indem die *spa*-Typen nach dem Grad ihrer Übereinstimmung an Repeats der Region X Gruppen (sogenannte Cluster) zugeordnet werden [48, 49]. Die Cluster können dann auch graphisch zweidimensional als Verknüpfung von *spa*-Typen dargestellt werden.

1.2.4 Accessory gene regulator (Agr)

Der *agr*-Genregulator ist der am intensivsten untersuchte Genregulator von *S. aureus*. Er koordiniert die Expression von zellwandständigen und löslichen Virulenzfaktoren invers durch Synthese eines selbst-induzierenden Peptids, abhängig von der Dichte der Bakterienpopulation (ein sogenanntes Quorum-sensing-System [50]; „Quorum-sensing“ bedeutet, dass der Effekt erst ab Überschreiten eines gewissen Schwellenwerts eintritt). Dabei wird in der exponentiellen Wachstumsphase einer *S. aureus*-Population besonders die Expression von Oberflächenproteinen induziert. In der stationären Phase dagegen überwiegt die Expression von löslichen Proteinen (Abb. 2) [51]. Diese sequentielle Expression von verschiedenen Virulenzfaktoren scheint klinische Bedeutung zu haben. In der Wachstumsphase ist besonders die Adhäsion für eine Kolonisierung von Wirtsgewebe von Bedeutung. Daher werden Proteine mit adhäsiver Funktion produziert.

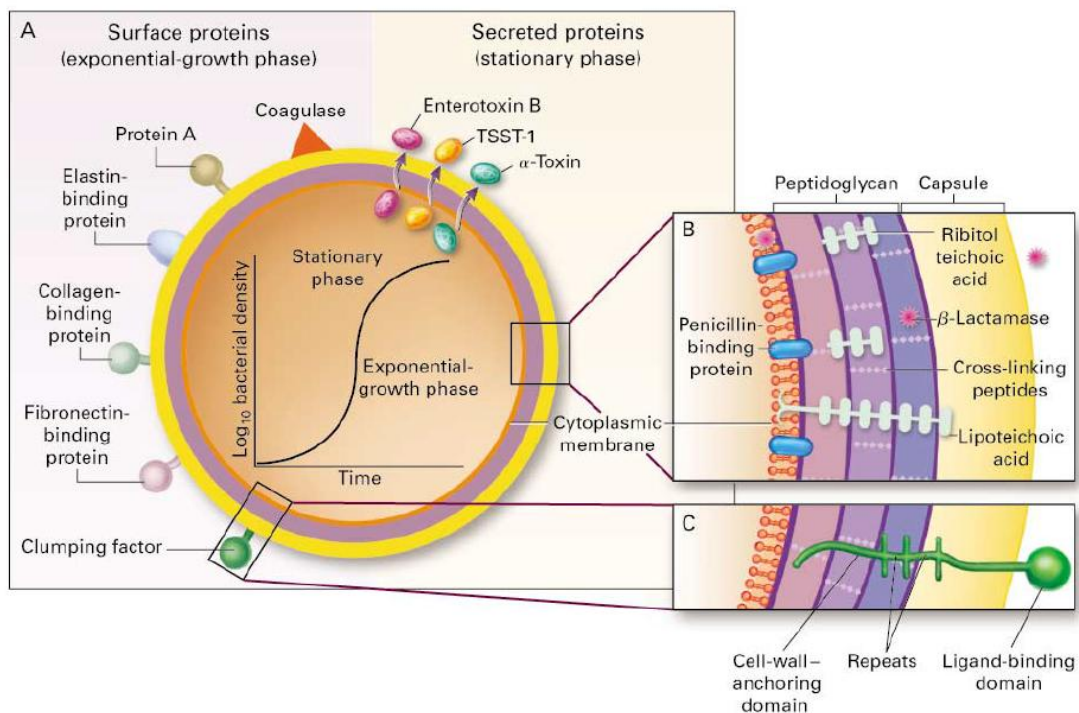


Abbildung 2. Regulation von Oberflächenproteinen und löslichen Proteinen von *S. aureus* durch den *agr*-Genregulator (und andere Regulatoren). In der exponentiellen Wachstumsphase werden vor allem Oberflächenproteine mit adhäsiver Wirkung exprimiert. In der stationären Phase überwiegt die Expression von löslichen Virulenzfaktoren. Abbildung entnommen aus [27].

In der stationären Phase sind die Schädigung von Wirtsgewebe und Ausbreitung im Körper von Bedeutung, deshalb werden vermehrt lösliche Virulenzfaktoren produziert [27].

Der *agr*-Genregulator wurde erstmals 1986 von Recsei et al. beschrieben [52]. Der *agr*-Genlocus besteht aus zwei divergierenden Operons, die von den benachbarten Promotoren P2 und P3 transkribiert werden [53] (siehe Abb. 3). Das P2-Operon enthält die vier Gene *agrB*, *D*, *C* und *A*. Die zwei Gene *agrA* und *agrC* kodieren dabei für Proteine eines klassischen Zweikomponenten-Systems [54]. Die zwei anderen Gene des P2-Promotors *agrB* und *agrD* generieren ein selbst-induzierendes Peptid (AIP, autoinducing peptide) [55, 56]. Das Transkript des P3-Operons, die RNAIII, ist der eigentliche Effektor des Agr-Systems [57]. Die RNAIII kodiert einerseits selbst für das δ -Hämolyisin [31, 32] (siehe Kapitel 1.2.1), andererseits steigert sie in einem komplexen Netzwerk die Expression von löslichen Virulenzfaktoren und supprimiert die Expression von Oberflächenproteinen. Ein dritter Promotor, P1, befindet sich nahe des 5'-Endes von *agrA* und zeigt nur wenig Aktivität. Er scheint zusätzlich die Transkription des *agrA*-Gens zu regeln [53].

Die Funktionsweise des *agr*-Genregulators stellt sich (nach aktuellem Kenntnisstand) folgendermaßen dar (siehe Abb. 3): Das *agrD*-Gen kodiert für ein Propeptid, das durch AgrB, ein Membranprotein, prozessiert und als AIP exprimiert wird. In der postexponentiellen Wachstumsphase akkumuliert das AIP extrazellulär und interagiert ab einer bestimmten Konzentration (Quorum-sensing) mit dem Transmembranrezeptorprotein AgrC (eine Histidin-spezifische Proteinkinase und Sensor des Zweikomponenten-Systems). AgrC aktiviert durch Übertragung einer Phosphatgruppe AgrA (Effektor des Zweikomponenten-Systems). AgrA aktiviert nun wieder seinen eigenen Promotor P2 und den divergierenden P3-Promotor, der mit der RNAIII den eigentlichen Effektor des Agr-Systems transkribiert [51].

Der *agr*-Genlocus von *S. aureus* ist nur teilweise konserviert. Die drei Gene *agrB*, *agrD* und *agrC* zeigen Sequenzvariationen, durch die innerhalb von *S. aureus* vier unterschiedliche *agr*-Typen (Typ I bis Typ IV) unterschieden werden können [58, 59].

Das AIP eines *S. aureus*-Stammes aktiviert dabei nur seinen eigenen *agr*-Genlocus und inhibiert die *agr*-Expression anderer Stämme. Diese Inhibition führt zu einer Modulation der Virulenzeigenschaften des anderen Stamms. Man nimmt an, dass dieser inhibitorische Effekt die Strategie eines etablierten Stamms ist, eine Neuinfektion mit ähnlichen Stämmen zu verhindern [58]. So konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige nasale Kolonisierung von verschiedenen *S. aureus*-Stämmen sehr selten ist und Stämme bei einer Co-Kolonisierung stets dem gleichen *agr*-Typ angehören [60]. Obwohl eine Korrelation von Virulenz und *agr*-Typ diskutiert wird, konnte diese bisher nicht eindeutig festgestellt werden [61].

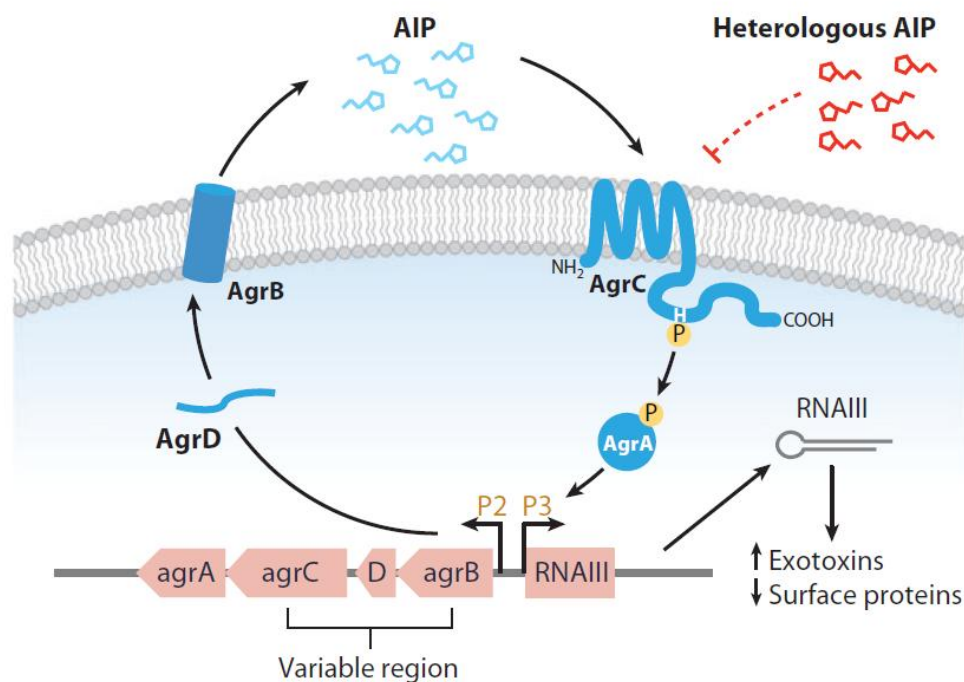


Abbildung 3. Funktionsweise des *agr*-Genregulators. Durch das Membranprotein AgrB wird das Propeptid AgrD prozessiert und als AIP sezerniert. Ab Überschreiten eines Schwellenwerts aktiviert das AIP ein Zweikomponenten-System AgrC/AgrA, wodurch die Promotoren P2 und P3 aktiviert werden und der Transkriptionsregulator RNAIII (der eigentliche Effektor des Systems) exprimiert wird. Hierdurch wird in der postexponentiellen Phase die Expression von löslichen Virulenzfaktoren gesteigert und die Expression von Oberflächenproteinen verringert. Heterologe AIPs inhibieren die Aktivierung des Agr-Systems. Durch eine variable Region im *agrBDC*-Genlocus können vier verschiedene *agr*-Typen unterschieden werden. AIP, autoinducing peptide. P, Promotor. Für weitere Details siehe Text. Abbildung entnommen aus [51].

1.2.5 Methicillin-Resistenz

Für die Resistenz von *S. aureus* gegenüber β -Lactam-Antibiotika ist das *mecA*-Gen verantwortlich. Das *mecA*-Gen wurde durch *S. aureus* vermutlich von der Tier-assoziierten Staphylokokken-Spezies *S. fleurettii* erworben [62] und kodiert für ein verändertes Penicillin-bindendes Protein (PBP2a oder PBP2') [63-65]. Die Penicillin-bindenden Proteine sind für *S. aureus* lebenswichtige Transpeptidasen, die durch Verknüpfung von Peptidoglykanen für die bakterielle Zellwandsynthese notwendig sind [66]. β -Lactam-Antibiotika sind Substratanaloga, die kovalent an PBPs binden und sie somit inaktivieren. Das durch das *mecA*-Gen kodierte veränderte PBP2a zeigt durch eine Strukturänderung eine wesentlich geringere Affinität gegenüber den bisher verfügbaren β -Lactam-Antibiotika (seit November 2008 war in der Schweiz mit Ceftobiprol das erste MRSA-wirksame Cephalosporin in Europa zeitweise zugelassen). Dadurch wird die Resistenz von MRSA gegenüber dieser Klasse von Antibiotika vermittelt.

Auf genetischer Ebene ist das *mecA*-Gen assoziiert mit der einer Genkassette, der staphylococcal chromosomal cassette *mec* (*SCCmec*). *SCCmec* kommt typischerweise nur bei MRSA vor, nicht aber bei MSSA. *SCCmec* ist ein potentiell mobiles genetisches Element. Andere wichtige Gene neben dem *mecA*-Gen in *SCCmec* sind *ccr*-Gene (cassette chromosome recombinase-Gene), die für solche Enzyme (Rekombinasen) kodieren, die für Exzision und Integration von *SCCmec* in das Genom von Bedeutung sind. Ein Teil der *SCCmec*-Kassetten (Typ II und III) tragen auch Resistenz-Gene gegenüber anderen Antibiotika als β -Lactam-Antibiotika in sich [67].

Zurzeit sind fünf verschiedene Klassen von *mec*-Gen-Komplexen (A, B, C1, C2 und D) und fünf verschiedene Klassen von *ccr*-Gen-Komplexen (1, 2, 3, 4, und 5) bekannt. Unterschiedliche Kombinationen beider Komplexe definieren verschiedene *SCCmec*-Typen (Abb. 4). Es sind bisher acht *SCCmec*-Typen bekannt: Typ I (Kombination aus Klasse 1 *ccr*-Gen-Komplex und Klasse B *mec*-Gen-Komplex), Typ II (2A), Typ III (3A), Typ IV (2B), Typ V(5C2), Typ VI (4B), Typ VII (5C1) und Typ VIII (4A) [68]. Typ VI wurde 2006 erstmals definiert [69], die Typen VII und VIII wurden 2008 erstmals beschrieben [68, 70]

(zur Unterscheidung von HA- und CA-MRSA anhand der *SCCmec*-Typisierung siehe Abschnitt 1.1).

Das *pls*-Gen konnte bisher auf *SCCmec*-Kassetten der Typen I und IV nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 1.2.2).

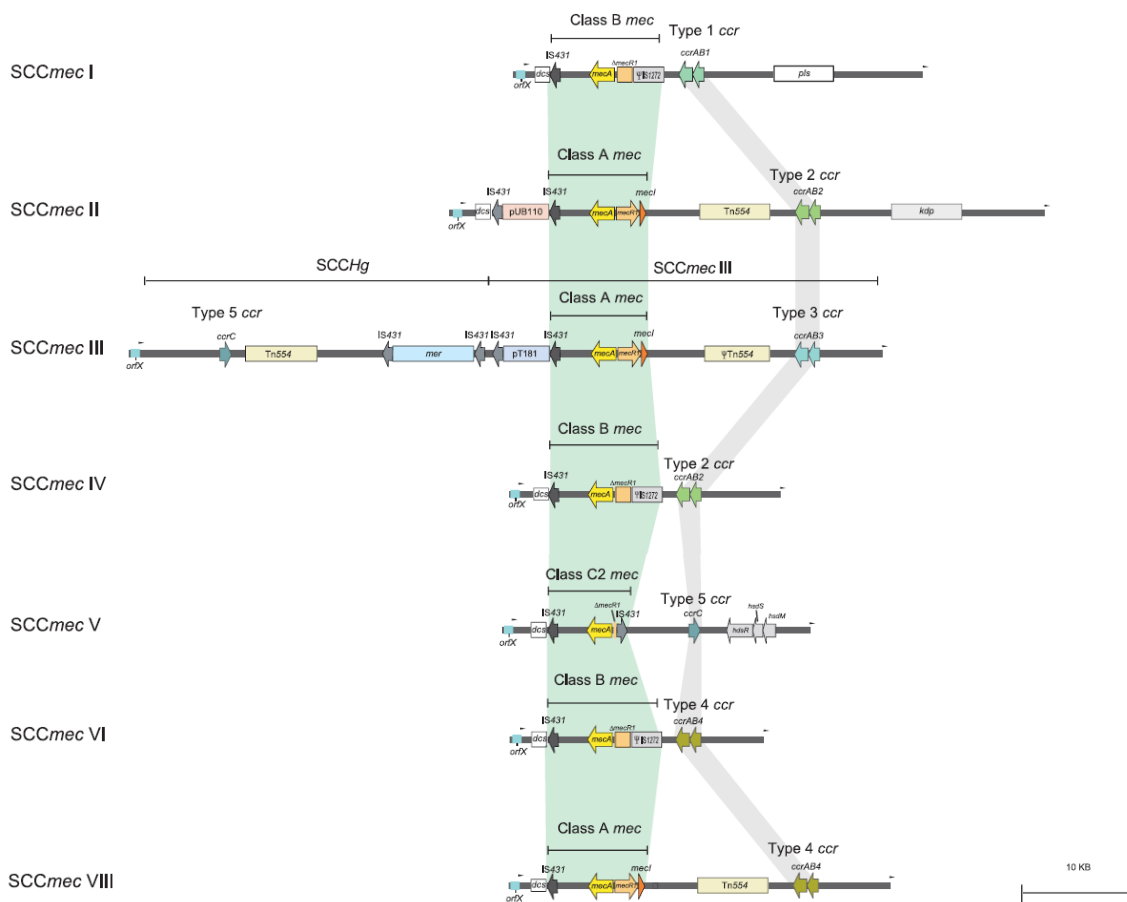


Abbildung 4. Schematische Darstellung der *SCCmec*-Typen I bis VI und VIII. Typ VII und das 2006 bei *S. aureus* erstmals beschriebene *SCCmec*-assoziierte „arginine catabolic mobile element“ (ACME) [71] sind in dieser Abbildung nicht aufgeführt. Die *mec*-Komplexe und *crr*-Komplexe, die die unterschiedlichen *SCCmec*-Typen definieren, sind grün bzw. grau hinterlegt. Bei *orfX* (jeweils am linken Ende blau hinterlegt) handelt es sich um ein Gen mit unbekannter Funktion, das die Insertionsstelle für *SCCmec* enthält. Die übrigen Bereiche zwischen und neben den *mec*- bzw. *crr*-Komplexen werden als J (joining)-Regionen bezeichnet (J1, J2 und J3, von rechts nach links). Die Abbildung wurde entnommen aus [72] (hier finden sich auch exakte Angaben der für die Sequenzierung dieser Kassetten verwendeten Stämme).

1.3 Fakultativ intrazellulärer *S. aureus* und mögliche klinische Relevanz

S. aureus wird klassischerweise als ein extrazellulärer Krankheitserreger betrachtet. Allerdings mehren sich die Anhaltspunkte dafür, dass *S. aureus* auch als fakultativ intrazellulärer Erreger von Bedeutung ist [73-76]. Im Besonderen einige klinische Eigenschaften von *S. aureus*-Infektionen unterstützen diese These. Die antibiotische Therapie von *S. aureus*-Infektionen (z.B. Osteomyelitis) ist häufig refraktär und Infektionen rezidivieren Monate oder selbst Jahre nach initial erfolgreicher Therapie [73]. Zudem neigen lokale und systemische *S. aureus*-Infektionen zur Ausbreitung in andere Organe. Die Möglichkeit des Erregers zur zellulären Adhäsion und Invasion könnte eine Erklärung dieser Eigenschaften liefern. Als fakultativ intrazellulärer Erreger wäre *S. aureus* beispielsweise vor extrazellulär wirksamen Antibiotika geschützt und könnte von einem intrazellulären Reservoir aus für rezidivierende Infektionen verantwortlich sein.

Anhand einer Vielzahl von *in vitro* Experimenten mit unterschiedlichsten Zelltypen konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* in der Lage ist, von verschiedensten Zelltypen aufgenommen zu werden und dort (teilweise) zu persistieren.

Zu diesen Zelltypen gehörten Tierzelllinien von Rindern (Endothelzellen [77-80] u.a.), Mäusen (Keratinocyten [81, 82], Osteoblasten [83-85], Makophagen [86, 87] u.a.) und Hühnern (Osteoblasten [88, 89] u.a.), sowie humane Zelllinien (Endothelzellen [90-97], Keratinocyten [98-100], Fibroblasten [90, 100], Osteoblasten [101, 102], professionelle Phagozyten [103-105] u.a.). Für einen Überblick über Modellsysteme mit intrazellulärem *S. aureus* siehe [74].

In Studien von Clément et al. [106] und Plouin-Gaudon et al. [107] konnte *S. aureus* intrazellulär in Biopsaten aus der Nasenschleimhaut von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis nachgewiesen werden. In einer weiteren aktuellen Studie wurde *S. aureus* intrazellulär in Biopsaten von Patienten mit rezidivierender Tonsillitis nachgewiesen [108].

Ob die zelluläre Invasion durch *S. aureus* dabei ein Ausdruck mikrobieller Virulenz oder eher ein Abwehrmechanismus der Wirtszelle ist, bleibt noch unklar [109].

Insgesamt scheint auch der genetische Hintergrund von *S. aureus* für die zelluläre Invasivität und möglicherweise auch das klinische Verhalten von Bedeutung zu sein [75]. Das Potential zellulärer Invasivität korreliert mit molekularen Markern von *S. aureus*. So konnte eine verminderte zelluläre Invasivität für *S. aureus*-Isolate mit SCC*mec* Typ I, Anwesenheit des *pls*-Gens und verschiedenen *spa*-Typen beobachtet werden [39]. In einer Studie von Fowler et al. [110] wurde ein Zusammenhang von bestimmten Genotypen (Clonal Complex 5 und 30) mit besonders komplikationsreichen Infektionen ermittelt. In einer weiteren Studie konnte bei Isolaten mit persistierender Bakteriämie eine höhere Frequenz von u.a. SCC*mec*-Typ II, Clonal Complex (CC) 30, *spa*-Typ 16 und *agr*-Typ III im Vergleich zu Isolaten, die mit einer transienten Bakteriämie assoziiert waren, gezeigt werden. In anderen Studien wiederum konnten keine genetischen Marker für eine erhöhte *in vivo* Virulenz gefunden werden [111, 112]. Abgesehen von solchen Genen, die für spezifische *S. aureus* assoziierte Erkrankungen verantwortlich sind (wie z.B. das TSST-1-Gen, siehe Kapitel 1.2), scheinen einzelne Gene zwar mit der zellulären Invasivität, aber nur fraglich mit invasiven Infektionen zu korrelieren. Der Vorgang der zellulären Invasion an sich konnte weitgehend aufgeklärt werden. *S. aureus* wird durch einen Reißverschluss-ähnlichen Mechanismus aufgenommen, bei dem FnBPs (Fibronectin-bindende Proteine) unter Vermittlung von Fibronectin an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine der Wirtszellmembran binden [113, 114] (Abb. 5). Dies führt zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und einem Umschließen des Bakteriums mit Bildung eines Phagosoms ähnlich einer Phagozytose durch professionelle Phagozyten [109]. Es zeigen sich dabei keine Unterschiede zwischen lebenden und abgetöteten Bakterien [113]. Die für FnBPs kodierenden Gene sind dabei (beinahe) universal in allen *S. aureus*-Isolaten vorhanden [61, 115].

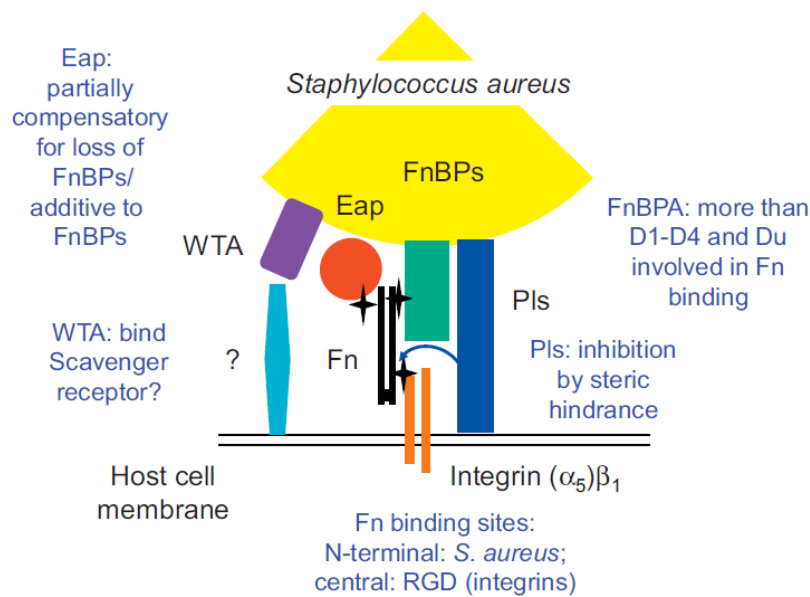


Abbildung 5. Modell des Invasionsmechanismus von *S. aureus*. Fibronectin-bindende Proteine (FnBPs) der bakteriellen Zellwand binden über Fibronectin (Fn) an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine der Wirtszelle. Plasmin-sensitives Protein (Pls) vermindert die zelluläre Invasion über den Mechanismus einer sterischen Inhibition (siehe Kapitel 1.2.2). Extracelluläre Adhärenzproteine (Eap) kann teilweise einen Verlust der FnBP-Funktion kompensieren. Wall teichonische Säuren (WTA, Teichonsäuren der bakteriellen Zellwand) sind bedeutsam für eine nasale Kolonisation durch *S. aureus* [116] und die Adhäsion an Endothelzellen (unter Fluss) [117]. Abbildung entnommen aus [75].

Auch wenn FnBPs eine herausragende Rolle für die zelluläre Invasivität von *S. aureus* spielen, sind zugleich andere Faktoren beteiligt. Eap, ein Protein aus der SERAM-Klasse (siehe 1.2) kann unter gewissen Umständen einen FnBP-Funktionsverlust kompensieren, Pls verringert die zelluläre Invasivität von *S. aureus* (siehe 1.2.2) und Teichonsäuren der bakteriellen Zellwand scheinen auch für Adhäsion (unter Fluss) und zelluläre Invasivität von *S. aureus* bedeutsam zu sein [75]. In zwei Studien konnte sogar eine FnBP-unabhängige Zellinvasion durch *S. aureus* festgestellt werden. Kintarak et al. fanden eine FnBP-unabhängige *in vitro*-Aufnahme von *S. aureus* in humane primäre Keratinozyten [98]. Brouillette et al. zeigten in einem Mastitis-Mausmodell und *in vitro* zwar eine verzögerte, aber nicht aufgehobene Aufnahme eines FnBP-defizienten *S. aureus*-Stamms in Brustepithelzellen von Rindern [118]. Schon in frühen Studien wurde eine Relevanz von *S. aureus*-Adhäsinen wie die Fibronectin-bindenden Proteine für invasive Infektionen *in vivo* vermutet.

Proctor et al. [119, 120] zeigte bereits 1984, dass *S. aureus*-Isolate von invasiven Infektionen eine höhere Kapazität haben, Fibronectin zu binden, als nicht-invasive Isolate. Kuypers et al. [121] konstruierten eine *S. aureus*-Mutante mit geringem Potential Fibronectin zu binden, die in einem Tierversuch mit Ratten auch eine geringe Adhäsion an traumatisiertes Herzklappengewebe zeigte. Johansson et al. [122] fanden in einem Mausmodell experimenteller Osteomyelitis bei Isolaten mit erhöhtem Potential, Fibronectin zu binden, auch eine höhere Wahrscheinlichkeit, eine Infektion zu etablieren. Que et al. [95] konnten in einem Tiermodell experimenteller Endokarditis an Ratten durch Expression von *S. aureus*-Adhäsinen im Bakterium *Lactococcus lactis* ebenfalls die Bedeutung der Fibronectin- und Fibrinogen-Bindfähigkeit für die Kolonisation und Invasion von Endothelzellen *in vivo* belegen.

Xiong et al. [123] konnten in einem Tiermodell an Kaninchen für MRSA-Isolate, die mit persistierender Bakteriämie assoziiert waren, u.a. ein erhöhtes *in vitro* Potential zur Adhäsion an Fibronectin zeigen. Im Kontrast zu diesen Ergebnissen steht eine Studie von Flock et al. [124], die in einem Tiermodell (Ratten) experimenteller Endokarditis keinen Unterschied in der *in vivo* Virulenz von Stämmen, mit unterschiedlicher Fähigkeit Fibronectin zu binden, finden konnte.

In der Zusammenschau deuten die oben genannten Erkenntnisse auf eine Bedeutung der Eigenschaft von *S. aureus* als fakultativ intrazellulärem Erreger für die Pathogenese und den Verlauf von Infektionen *in vivo* hin. Allerdings stützt sich diese Hypothese vor allem auf Daten aus *in vitro* Studien und Tiermodellen. Auch wenn die Vermutung nahe liegt, steht der Beleg für einen Zusammenhang von zellulärer Invasivität *in vitro* und Virulenz von *S. aureus in vivo* mangels klinischer Daten für Infektionen beim Menschen bislang aus.

2 Problemstellung und Zielsetzung

In zunehmendem Maße wird die Bedeutung von *S. aureus* als fakultativ intrazellulärer Krankheitserreger bekannt [74, 75]. *S. aureus* ist in der Lage, von einer Vielzahl an unterschiedlichen Wirtszellen *in vitro* aufgenommen zu werden und dort zu überleben [74]. Auch in unterschiedlichen humanen *ex vivo* Biopsaten konnte *S. aureus* intrazellulär nachgewiesen werden [106-108]. Der Mechanismus zellulärer Invasivität ist größtenteils bekannt und basiert vor allem auf einer Interaktion von Fibronektin-bindenden Proteinen auf Seiten der Bakterien mit $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen der Wirtszellen [113, 114]. Die zelluläre Invasivität korreliert dabei mit einer Reihe von molekularen Markern wie dem SCC*mec*- und *spa*-Typ [39]. Eine Anzahl an *in vitro*- und Tiermodell-Studien legt die Relevanz der Fähigkeit von *S. aureus* zur Bindung von Fibronektin und damit zur zellulären Invasivität für den Verlauf einer Infektion *in vivo* nahe [95, 119, 120, 122]. Allerdings steht bislang ein direkter Nachweis des Zusammenhangs von *in vitro* Invasivität mit *in vivo* Virulenz von *S. aureus* aus [76].

Als Konsequenz dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit untersucht,

- ob die Korrelation von zellulärer Invasivität und molekularen Markern auch in einem natürlichen Kollektiv klinischer MRSA-Isolate reproduzierbar ist. Hierzu muss geprüft werden, ob die gesammelten MRSA-Isolate ein kongruentes Abbild einer natürlichen MRSA-Population darstellen.
- ob es neben den bekannten molekularen Markern zellulärer Invasivität weitere bisher nicht bekannte Marker zellulärer Invasivität gibt.
- ob sich kolonisierende und Infektions-assoziierte MRSA-Isolate bezüglich ihres Potentials zellulärer Invasivität unterscheiden. Hierzu wird zusätzlich eine externe Referenzgruppe etabliert, deren *S. aureus*-Isolate klinisch mit vergleichsweise invasiven Infektionen assoziiert sind.
- und ob bei bekannter Korrelation von molekularen Markern und zellulärer Invasivität durch alleinige Bestimmung der molekularen Marker eine Risikoabschätzung bezüglich der *in vivo* Virulenz eines Isolates vorgenommen werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Herkunft der Bakterien

Die 109 MRSA-Isolate dieser Arbeit wurden im Rahmen einer MRSA-Prävalenz-Studie am Universitätsklinikum in Würzburg während eines achtmonatigen Zeitraumes von Juli 2007 bis März 2008 gesammelt (Tab. 1). Die Prävalenz-Studie unter der Leitung des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg [125] schloss 9 Stationen ein, auf denen alle neu aufgenommenen Patienten im oben genannten Zeitraum durch einen Nasenabstrich auf eine Besiedlung durch MRSA untersucht wurden. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität im Mai 2007 (Referenznummer 62/07) genehmigt. Für die vorliegende Arbeit wurden zusätzlich auch Fälle eingeschlossen, bei denen das initiale MRSA-Screening aus einer anderen Probe als dem Nasenabstrich erfolgte (192 zusätzliche Fälle) und wenn das initiale Screening mehr als zwei Tage nach Aufnahme des Patienten erfolgte (weitere 351 zusätzliche von insgesamt 3913 Fällen). Im Fall einer vermuteten bakteriellen Infektion wurde zusätzlich Material vom Infektionsfokus entnommen und auf MRSA untersucht. Der klinische Verlauf von Patienten mit MRSA-assoziiierter Kolonisation oder Infektion wurde durch ärztliche Mitarbeiter des Instituts nachverfolgt. Das von den Stationen eingesandte Material wurde im Routinelabor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie durch den GeneOhm™ MRSA-Schnelltest (Becton Dickinson, Heidelberg) untersucht. Dieser molekulare MRSA-Test basiert auf der PCR-Amplifikation einer DNA-Sequenz nahe der Insertionsstelle der SCC*mec*-Kassette und Detektion der Sequenz durch fluoreszierende Oligonukleotide [126]. Die Proben wurden zusätzlich auf Columbia-Agar mit 5% Schafblut (Beurteilung von Koloniengröße, Pigmentierung und Hämolyse), Baird-Parker-Agar (selektiver Agar zur Kultivierung von *S. aureus*) und CHROMagar™ (selektiver Agar zur Kultivierung von MRSA) ausgestrichen. *S. aureus*-verdächtige Kolonien wurden einer Speziesidentifizierung im VITEK 2 (siehe 3.15) zugeführt. Die Anwesenheit des *mecA*-Gens wurde durch eine *mecA*-PCR (siehe 3.11), die Methicillin-Resistenz zusätzlich durch einen

Agardiffusionstest mit 30 µg Cefoxitin bestätigt. Während eines dreimonatigen Zeitraumes der Prävalenz-Studie wurden durch Johanna Priller in der Arbeitsgruppe im Rahmen ihrer zahnmedizinischen Promotionsarbeit zusätzlich alle Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Isolate (MSSA) des gleichen Kollektivs gesammelt (Tab. 1) und *spa*-typisiert (siehe 3.12).

Als externe Referenzgruppe für *S. aureus*-Isolate, die klinisch mit vergleichsweise invasiven Infektionen assoziiert sind, wurden aus der Stammsammlung des Routinelabors 13 mit Osteomyelitis (12 Isolate; 9 MRSA und 3 MSSA) bzw. Endokarditis (1 Isolat; 1 MSSA) assoziierte Isolate übernommen, die zwischen Januar und November 2007 von Patienten des Universitätsklinikums in Würzburg isoliert worden waren (Tab. 3 und Tab. 4). *S. aureus*-Stamm Cowan I (ATCC 12598) und *S. carnosus*-Stamm TM300 [127] wurden als Referenzstämme für den Invasions-Test verwendet.

3.1.1 Anlegen einer Übernachtkultur

Vor jedem Experiment wurde eine frische Übernachtkultur des jeweiligen Bakterienstammes angelegt. Hierzu wurden mit einer sterilen Einmalimpföse wenige Kolonien (ca. 1-3) vom auf Schafblutagar ausgestrichenen Stamm aufgenommen und in ein steriles 15 ml-Falcon-Plastikröhrchen mit 5 ml Müller-Hinton-Bouillon (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt. Das Falcon-Röhrchen mit der Bakteriensuspension wurde dann über Nacht bei 37°C ohne Schütteln bebrütet. Für das Einfrieren von Bakterien wurde die Bakteriensuspension über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bebrütet, um eine höhere Bakterienkonzentration zu erreichen.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen der Bakterien

Um die Bakterien langfristig zu lagern, wurden sie nach folgender Prozedur eingefroren. 1,5 ml einer frischen und gut durchmischten Übernachtkultur wurden in ein 1,5 ml-Kryo-Röhrchen gegeben und 5 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde wieder 1 ml der Übernachtkultur hinzugegeben und resuspendiert. Nun wurden 500 µl Glycerin (70%; Carl Roth, Karlsruhe) hinzugegeben, um beim Einfrieren ein Auskristallisieren der Flüssigkeit zu verhindern. Der Ansatz wurde erneut gut

durchmischt. Die Kryo-Röhrchen wurden dann in einer -80°C Kühltruhe verwahrt. Aus den Kryo-Röhrchen wurden die Bakterien bei Bedarf mit einer sterilen Einmalimpföse auf Schafblutagar ausgestrichen (3-Ösen-Ausstrich) und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.2 Kultur der 293-Zellen

293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die auch als HEK-293 (human embryonic kidney) bezeichnet werden. Es handelt sich um adhärenzte Zellen. Sie dienen als zelluläres Modell für den durchflusszytometrischen Invasions-Test. Die 293-Zellen wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Referenznummer ACC 305) in Braunschweig bezogen [128].

3.2.1 Material und Hersteller

Vollmedium:	DMEM/F-12 mit GlutaMAX™-1 (stabiles Dipeptid L-Alanyl-L-Glutamin) mit Phenolrot als pH-Indikator 50 IU/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 10% Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Darmstadt ICN Biochemicals , Aurora, USA PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Einfriermedium:	DMEM/F-12 (s.o.) 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) 10% FKS	Invitrogen, Darmstadt Sigma-Aldrich, Taufkirchen PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA 5%		Invitrogen, Darmstadt
Dulbecco's PBS 1x		Invitrogen, Darmstadt

3.2.2 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden vom DMSZ in gefrorenem Zustand geliefert und sind bei -196°C in flüssigem Stickstoff für längere Zeit haltbar. Eingefroren wurden die Zellen in Einfriermedium mit 10% DMSO.

Damit die Zellen nach dem Auftauen durch das zugesetzte DMSO keinen Schaden nehmen konnten, wurden sie, sobald der Inhalt des Kryo-Röhrchens verflüssigt war, mit der Pipette in 20-30 ml Vollmedium überführt. Anschließend wurde die so entstandene Zellsuspension 7 min bei 1200 rpm und

Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wieder in Vollmedium aufgenommen (ca. 20 ml Vollmedium pro 75 cm² Kulturflasche).

3.2.3 Passage der Zellen

Die Zellen wurden bei einem Aufteilungsverhältnis von 1:5 und Bebrütung mit 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit sowie 5% CO₂ in der Regel zweimal pro Woche passagiert, sobald sie in der Kulturflasche einen subkonfluenten Rasen gebildet hatten.

Die Zellen wurden nach gründlicher Inspektion unter dem Mikroskop (Beurteilung von Zellmorphologie und Suche nach Kontamination) einmal mit 10 ml PBS gewaschen, um Zelltrümmer zu entfernen und darauf mit 1 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Die Ablösung der Zellen erfolgte unter Sichtkontrolle. Sobald die Zellen sich abgelöst hatten, wurde der Vorgang durch Zugabe von 9 ml Vollmedium gestoppt (das Vollmedium enthält FKS und somit Antitrypsin). Die Zellen wurden anschließend vorsichtig mit der Pipette resuspendiert und anteilig in eine mit neuem Medium gefüllte Kulturflasche überführt. Wird die Ablösung der Zellen durch Trypsin-EDTA mit 9 ml Vollmedium gestoppt und jeweils 2 ml Zellsuspension in eine neue Kulturflasche gegeben, erreicht man ein Aufteilungsverhältnis von 1:5.

3.3 Invasions-Test

Der Invasions-Test wurde angewandt, um die Fähigkeit von Bakterien (in dieser Studie MRSA) zu messen, in Wirtszellen (hier 293-Zellen) einzudringen. Hierbei wurden Bakterien mit einem kovalenten Fluoreszenz-Farbstoff (FITC) markiert und mit Wirtszellen inkubiert. Die Invasivität wurde mit einem Durchflusszytometer indirekt als Durchschnittswert der von in Wirtszellen befindlichen Bakterien ausgehenden Fluoreszenz gemessen. Um Adhärenz von Invasion zu trennen, war es wichtig, die Zellen nach der Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Bakterien mit Trypsin-EDTA zu behandeln. Durch diesen Schritt wurden auf der Zelloberfläche haftende Bakterien entfernt.

Die Invasivität wird als Prozentwert in Relation zur Invasivität des *S. aureus*-Referenzstammes Cowan I angegeben. Als Negativkontrolle wurde bei jedem Experiment der *Staphylococcus carnosus*-Stamm TM300 mitgeführt, der keine bekannten Adhäsine exprimiert und so ein geringes Potential zellulärer Invasivität aufweist [128].

3.3.1 Material und Hersteller

Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC) 96%	Invitrogen, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Müller-Hinton-Boullion	Becton Dickinson, Heidelberg
Formaldehydlösung ≥37%	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium-Monensin	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Propidiumjodid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Human-Albumin (HSA) 20%	Behring, Marburg
Grundmedium: Medium DMEM/F-12 + GlutaMAX™-1	Invitrogen, Darmstadt
Invasionsmedium: Medium DMEM/F-12 + GlutaMAX™-1	Invitrogen, Darmstadt
	1% HEPES-Puffer 1M Lösung
	5% Human-Albumin s.o.
Weißes Medium: DMEM/F-12 ohne Phenolrot	Invitrogen, Darmstadt
	10% Fetales Kälberserum (FKS)
	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypanblau 0,4%	ICN Biochemicals, Aurora, USA
Trypsin-EDTA 5%	Invitrogen, Darmstadt
Dulbecco's PBS 1x	Invitrogen, Darmstadt

3.3.2 Vorbereitung der Zellen

Für den Invasions-Test wurde jeweils eine Kulturflasche mit dichtem Zellrasen benötigt. Die Zellen wurden abgelöst, wie bei der Passage der Zellen (siehe 3.2.3), dann aber in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und in einer 1:10-Verdünnung mit Trypanblau (45 µl Trypanblau, 5 µl Zellen) in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die gewünschte Zelldichte für den Versuch betrug 400.000 Zellen pro ml Zellsuspension. Da die tatsächliche Zelldichte aber immer höher als gewünscht war, wurden die Zellen mit Grundmedium entsprechend verdünnt. Darauf wurde je 1 ml der Zellsuspension in eine Vertiefung einer Platte mit 24 Vertiefungen

überführt und eine Nacht bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Atmosphäre bebrütet.

Am nächsten Tag wurden die Zellen in den Vertiefungen mit Grundmedium einmal gewaschen und anschließend 500 µl Invasionsmedium und 50 µl Bakteriensuspension (siehe 3.3.3) pro Vertiefung hinzugegeben. Zwei Vertiefungen wurden für den Zell-Leerwert ohne Bakteriensuspension belassen. Auf eine einstündige Inkubation im Kühlschrank bei 4°C für die Sedimentation der Bakterien folgte die eigentliche zweistündige Invasionsphase bei 37°C im Brutschrank.

Nach Ablauf der Invasionsphase wurden die Zellen wieder mit Grundmedium gewaschen und darauf mit 200 µl Trypsin-EDTA pro Vertiefung abgelöst. Die Reaktion wurde nach Ablösung der Zellen sofort mit 1 ml Weißem Medium pro Vertiefung gestoppt. In diesem Schritt war ein Medium ohne Phenolrot wichtig, da Phenolrot die durchflusszytometrische Messung stören würde.

Die Zellen wurden anschließend in auf Eis gelagerte FACS-Röhrchen (12 mm mal 75 mm Polystyren-Falcon-Röhrchen) überführt und bei 1200 rpm fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen erneut auf Eis gestellt und in 1 ml 1%-HSA-Lösung pro Röhrchen resuspendiert. HSA belegt Bindestellen an der Gefäßwand und verhindert, dass sich Zellen dort anlagern.

3.3.3 Vorbereitung der Bakterien

Von jedem zu testenden Stamm wurde eine Übernachtskultur in 5 ml Müller-Hinton-Bouillon angesetzt und bei 37°C über Nacht ohne Schütteln bebrütet.

Am nächsten Morgen wurden die Bakterien zunächst 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Bakterien einmal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden wieder 2,5 ml PBS zu den Bakterien gegeben.

Anschließend erfolgte die Zugabe von je 2,5 ml 2%-Formaldehydlösung zur Abtötung der Bakterien (Endkonzentration Formaldehyd 1%). Die Bakterien wurden daraufhin eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Bakterien wieder zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Im Anschluss an einen erneuten Waschschrift mit PBS, erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes erfolgte die Färbung der Bakterien mit je 3 ml einer Lösung mit der Endkonzentration 100 µg FITC pro ml Bakteriensuspension. Das FITC-Pulver wurde dafür vorher in 1 ml DMSO pro mg FITC aufgelöst und die so entstandene Mischung mit dem Natriumcarbonat-Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH 9-10) auf die benötigte Menge aufgefüllt. In dieser Lösung wurden die Bakterien eine Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert, dann wiederum zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Bakterien wurden nach Absaugen des Überstandes in 1 ml 1%-Human-Albumin-Lösung resuspendiert und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurde zur Standardisierung der Konzentration die Streuung der einzelnen Bakteriensuspensionen im Photometer (bei $\lambda=540$ nm) in einer 1:10-Verdünnung mit PBS gemessen. Die optische Dichte wurde durch Verdünnung mit PBS auf eins eingestellt. Von dieser Suspension wurden im Verlauf des Experimentes 50 µl auf die Zellen gegeben.

Zur Messung der Bakterien im Durchflusszytometer wurden pro FACS-Röhrchen 500 µl 1%-HSA in PBS und 50 µl eingestellte Bakteriensuspension gegeben.

3.3.4 Vorbereitung von Zellen und Bakterien

In die auf Eis gestellten FACS-Röhrchen mit den Zellen wurde noch je 1 µl Monensin (20 µM) gegeben und die Röhrchen anschließend für 10 min aus dem Eis genommen und in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Danach wurden die Zellen bzw. Bakterien wieder auf Eis gestellt.

Monensin ist ein Ionophor (genauer ein Na^+/H^+ -Austauscher), das dazu dient, das saure Milieu der Phagosomen in den Zellen zu neutralisieren, da FITC im sauren Milieu weniger gut fluoresziert.

Unmittelbar vor der Messung im Durchflusszytometer erfolgte schließlich die Zugabe von 50 µl Propidiumjodid pro FACS-Röhrchen. Propidiumjodid ist ein nukleinsäureinterkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der durch eine intakte

Zellmembran nicht in die Zellen eindringen kann. Bei untergegangenen/ toten Zellen ist das Propidiumjodid jedoch in der Lage, die Zellmembran zu überwinden und lagert sich in die DNA ein, wodurch die Fluoreszenz aktiviert wird. Die Zugabe von Propidiumjodid dient also der Detektion toter Zellen. Vor Messung im Durchflusszytometer wurden die FACS-Röhrchen gründlich durchmischt.

3.4 Durchflusszytometrie

Mithilfe des Lasers im Durchflusszytometers kann eine Zellpopulation zum einen in Hinblick auf Größe und Granularität untersucht werden, zum anderen können fluoreszierende Farbstoffe detektiert werden. Zur Messung der Invasivität wurde in diesem Experiment die Fluoreszenz von FITC-markierten Bakterien gemessen, die zuvor in einem Invasions-Test von Wirtszellen aufgenommen worden waren. Die Messung der Invasivität erfolgte also indirekt über einen an die Bakterien gebundenen Fluoreszenzfarbstoff als Fluoreszenz pro Zelle. Um die Intensität der Fluoreszenzmarkierung des einzelnen Bakterienstammes zu ermitteln, wurden die fluoreszenzmarkierten Bakterien vorher separat (also ohne Zellen) gemessen. Durch gleichzeitige Messung der Größe und Granularität der Wirtszellen und Detektion der Fluoreszenz von Propidiumjodid (siehe 3.3.4) konnte zwischen intakten Zellen und sogenanntem Zell-Detritus unterschieden werden. Um Adhärenz von Wirtszellen untereinander und von Bakterien auf der Zelloberfläche (dies würde die Messung der Invasivität verfälschen) zu vermeiden, wurden die Zellen nach der Invasionsphase und vor der Messung im Durchflusszytometer mit Trypsin-EDTA behandelt (siehe 3.3.2) und gut resuspendiert. Außerdem wurden die unspezifischen Bindungsstellen an der Reaktionsgefäßwand mit HSA abgedeckt. Jede Messung beinhaltete einen Zell-Leerwert, eine Positivkontrolle (*S. aureus*-Stamm Cowan I) und eine Negativkontrolle (*S. carnosus*-Stamm TM300) [128].

3.5 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus den Bakterienstämmen für die SCC*mec*-Kassetten-, *pls*- und *agr*-Typisierung wurde mit folgender auf einer Phenolextraktion basierenden Methode durchgeführt.

3.5.1 Material und Hersteller

TNE (500ml)	6 g 0,1 M Tris 4,35 g 0,15 M Natriumchlorid 14,5 g 0,1 M EDTA mit dH ₂ O auf 500 ml auffüllen und mit 10 M Natronlauge auf pH 8,0 einstellen	Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe AppliChem, Darmstadt
TNE/Triton X	TNE 1% Triton X 100	s.o. Carl Roth, Karlsruhe
Lysostaphin 1 mg/ml		AMBI Products, NY, USA
Proteinase K 20 mg/ml		Qiagen, Hilden
Phenol		AppliChem, Darmstadt
Chloroform		Merck, Darmstadt
Natriumacetat 3 M		Merck, Darmstadt
Ethanol 100% und 70% dH ₂ O		Carl Roth, Karlsruhe Fresenius Kabi, Bad Homburg

3.5.2 Durchführung

Etwa 2 ml der betreffenden Übernachtskultur (siehe 3.1.1) wurden 5 min bei 13.000 rpm in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgenommen und wieder 2 ml Übernachtskultur hinzugegeben. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und Abnahme des Überstandes wurde mit 1 ml TNE resuspendiert. Nach nochmaliger fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und Abnahme des Überstandes wurden die Bakterien in 575 µl TNE/Triton X resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl Lysostaphin (1 mg/ml) wurde der durchmischte Ansatz bei 37°C eine Stunde inkubiert. Nach einer Stunde wurden 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugegeben, resuspendiert und zwei weitere Stunden bei 65°C inkubiert. Pro Ansatz wurden nun 600 µl Phenol hinzugefügt und etwa 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die klare obere Phase, die die chromosomale DNA enthielt, vorsichtig in ein frisches 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 600 µl Chloroform (unter einem Abzug)

hinzugefügt, resuspendiert und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die klare obere Phase wurde erneut in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden dann 50 µl 3 molares Natriumacetat sowie 1250 µl 100% eiskaltes Ethanol hinzugefügt, der Ansatz vorsichtig durchmischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die DNA wurde nun in 70% Ethanol gelöst und für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Waschen mit 70% Ethanol wurde noch einmal wiederholt. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wurde die DNA ca. 20 min bei Raumluft getrocknet, anschließend in 900 µl dH₂O resuspendiert und für eine kurzfristige Verwendung bei 4°C verwahrt. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.6 Messung und Einstellung der DNA-Konzentration

Nach Extraktion der chromosomalen DNA wurde der DNA-Gehalt jeder Probe mittels NanoDrop 1000 Spectrophotometer bestimmt. Initialisierung und Kalibrierung des Gerätes erfolgten mit destilliertem Wasser. Zur Messung wurden 2 µl jeder Probe in das Gerät gegeben. Die folgende Einstellung des DNA-Gehaltes auf die gewünschte Konzentration erfolgte durch Verdünnung der Probe mit destilliertem Wasser.

3.7 Gelelektrophorese und Auswertung

3.7.1 Material und Hersteller

1 l 50x TAE	242 g Tris 57,2 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA mit dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen und mit 10 M Natronlauge auf pH 8,0 einstellen	Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe AppliChem, Darmstadt
Agarose		Carl Roth, Karlsruhe
1 ml Ladepuffer	100 µl DNA 100 bp Leiter	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
	167 µl 6x blaues Färbemittel	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
	733 µl dH ₂ O	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Ethidiumbromid 0,1%		Merck, Darmstadt

3.7.2 Herstellung eines 1,5% Agarosegels

1,5% Agarose wurden in 1x TAE gelöst und unter Rühren langsam bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht. Anschließend wurde das Gel unter weiterem Rühren etwas abgekühlt und dann direkt in den Kammereinsatz mit eingelegtem Gel-Kamm gegossen und dort zur vollständigen Abkühlung belassen.

3.7.3 Elektrophorese des PCR-Produkts

Ca. 10 µl des PCR-Produktes und 40 µl Ladepuffer wurden pro Gelkammer geladen. Die Laufzeit betrug ca. 40 min bei 120 V.

3.7.4 Ethidiumbromid-Färbung und Dokumentation

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel zur Färbung der DNA 10 min in ein 0,1%-Ethidiumbromidbad eingelegt und anschließend in destilliertem Wasser etwa 10 min entfärbt. Zur Dokumentation wurden die fluoreszierenden Banden unter UV-Licht in einer Fotodokumentationsanlage sichtbar gemacht und ein entsprechendes Bild ausgedruckt.

3.8 SCCmec-Typisierung

Die Typisierung der SCCmec-Kassette der Studienisolate wurde nach Boye et al. [129] durchgeführt. Mit dieser Methode kann durch eine Multiplex-PCR mit 8 verschiedenen spezifischen Primern zwischen den SCCmec-Typen I bis V unterschieden werden.

3.8.1 Material und Hersteller

PCR-Puffer 10x	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
Taq DNA Polymerase	
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	
dH ₂ O	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Primer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	β, α3, ccrCF, ccrCR, 1272F1, 1272R1, 5RmecA, 5R431

3.8.2 Durchführung

Nach Isolierung von chromosomaler DNA des betreffenden Bakterienstammes (siehe 3.5) wurden 1 µl (ca. 5 ng DNA), 35,4 µl dH₂O, 5 µl 10x PCR-Puffer, 0,2 µl Taq DNA Polymerase (1 U), 0,4 µl dNTPs (je 200 µM) und je 1 µl der Primer β (0,2 µM), α3 (0,2 µM), ccrCF (0,25 µM), ccrCR (0,25 µM), 1272F1 (0,08 µM), 1272R1 (0,08 µM), 5RmecA (0,1 µM) und 5R431 (0,1 µM) zu einem Ansatz von 50 µl zusammengefügt.

Die PCR erfolgte mit einer initialen Denaturierung von 240 s bei 94°C, gefolgt von 30 Zyklen aus Denaturierung von 30 s bei 94°C, Primer-Hybridisierung von 30 s bei 50°C und Elongation von 60 s bei 72°C. Die abschließende Elongation wurde auf 240 s bei 72°C eingestellt.

Zur weiteren Bearbeitung des PCR-Produktes siehe Kapitel 3.7. Die Analyse der spezifischen Bandenmuster und Zuordnung zu einem der SCC*mec*-Typen I bis V wurde mit folgender Tabelle vorgenommen (Tabelle entnommen aus [129]). Als Positivkontrollen wurden die Stämme BS211 (SCC*mec*-Typ IV) und BS213 (SCC*mec*-Typ V) bei jedem Experiment mitgeführt.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)	Ziel-Gen	SCC <i>mec</i> -Typ				
				I	II	III	IV	V
β	ATTGCCTTGATAATAGCCYTCT	937	<i>ccrA2-B</i>		X		X	
α3	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT							
ccrCF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	518	<i>ccrC</i>			X		X
ccrCR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT							
1272F1	GCCACTCATAACATATGGAA	415	IS1272	X			X	
1272R1	CATCCGAGTGAAACCCAAA							
5RmecA	TATACCAAACCCGACAACACTAC	359	<i>mecA</i> -IS431					X
5R431	CGGCTACAGTGATAACATCC							

3.9 *pls*-PCR

Die Detektion des *pls*-Gens, das für das für das *S. aureus*-Oberflächenprotein Pls (Plasmin-sensitives Protein) kodiert, wurde mit einer PCR aus zwei spezifischen Primern durchgeführt.

3.9.1 Material und Hersteller

PCR-Puffer 10x		New England Bio Labs, Frankfurt a. M.
Taq DNA Polymerase		
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate)		
dH ₂ O		Fresenius Kabi, Bad Homburg
Primer	PlsF, PlsR	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.9.2 Durchführung

Nach Isolierung von chromosomaler DNA des betreffenden Bakterienstammes wurden 4 µl DNA (5 ng/µl), 38,4 µl dH₂O, 5 µl 10x PCR-Puffer, 0,2 µl Taq DNA Polymerase (1 U), 0,4 µl dNTPs (je 200 µM) und je 1 µl der Primer PlsF (10 µM) und PlsR (10 µM) zu einem Ansatz von 50 µl zusammengefügt.

Die PCR erfolgte mit einer initialen Denaturierung von 240 s bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen aus Denaturierung von 60 s bei 94°C, Primer-Hybridisierung von 60 s bei 58°C und Elongation von 60 s bei 72°C. Die abschließende Elongation wurde auf 240 s bei 72°C eingestellt.

Zur weiteren Bearbeitung des PCR-Produktes siehe Kapitel 3.7. Die Analyse des spezifischen Bandenmusters wurde anhand folgender Tabelle vorgenommen. Als Positivkontrolle wurde der *pls*-positive Stamm BS205 bei jedem Experiment mitgeführt.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)
PlsF	GGGGTGGTTAATGGTATGAATAAA	1117
PlsR	CGGAATGTTGCTCTTGTTGTGCGTTTTTC	

3.10 agr-Typisierung

Die *agr*-Typisierung zur Identifikation der *agr*-Typen I bis V wurde von Edward Makgotlho in der Arbeitsgruppe nach einer modifizierten Methode von Lina et al. [130] durchgeführt. Das *agr* (accessory gene regulator)-Gen kodiert für einen globalen Genregulator, der die Expression einer Vielzahl von unterschiedlichen löslichen und zellwandständigen Virulenzfaktoren von *S. aureus* steuert.

3.10.1 Material und Hersteller

PCR-Puffer 10x		New England Bio Labs, Frankfurt a. M.
Taq DNA Polymerase		
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate)		
dH ₂ O		Fresenius Kabi, Bad Homburg
Primer	<i>agr1-4_{Sa}-1</i> , <i>agr1_{Sa}-2</i> , <i>agr2_{Sa}-2</i> , <i>agr3_{Sa}-2</i> , <i>agr4_{Sa}-2</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.10.2 Durchführung

Nach Isolierung von chromosomaler DNA des betreffenden Bakterienstammes wurden 1 µl DNA (ca. 30 ng), 40,5 µl dH₂O, 5 µl 10x PCR-Puffer, 1 µl dNTP (je 25 mM), 0,5 µl Taq DNA Polymerase, 1 µl der Primer *agr1-4_{Sa}-1* und je 0,25 µl der Primer *agr1_{Sa}-2*, *agr2_{Sa}-2*, *agr3_{Sa}-2* und *agr4_{Sa}-2* zu einem Ansatz von 50 µl zusammengefügt.

Die PCR erfolgte mit einer initialen Denaturierung von 300 s bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen aus Denaturierung von 60 s bei 95°C, Primer-Hybridisierung von 60 s bei 55°C und Elongation von 120 s bei 72°C. Die abschließende Elongation wurde auf 600 s bei 72°C eingestellt.

Zur weiteren Bearbeitung des PCR-Produktes siehe Kapitel 3.7. Die Analyse der spezifischen Bandenmuster und Zuordnung zu einem der *agr*-Typen I bis IV wurde mit folgender Tabelle vorgenommen (Tabelle entnommen aus [130]). Als Positivkontrollen wurde die Stämme RnI (*agr*-Typ I), RN6607 (*agr*-Typ II), RN3984 (*agr*-Typ III) und RN4850 (*agr*-Typ IV) bei allen Experimenten mitgeführt.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)	Ziel-Gen	<i>agr</i> -Typ
<i>agr1-4_{Sa}-1</i>	ATGCACATGGTGACATGC		<i>agr_{Sa}</i>	
<i>agr1_{Sa}-2</i>	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	439	<i>agr-1_{Sa}</i>	I
<i>agr2_{Sa}-2</i>	TATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	572	<i>agr-2_{Sa}</i>	II
<i>agr3_{Sa}-2</i>	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	321	<i>agr-3_{Sa}</i>	III
<i>agr4_{Sa}-2</i>	CGATAATGCCGTAATACCCG	657	<i>agr-4_{Sa}</i>	IV

3.11 *mecA*-PCR

Die *mecA*-PCR wurde vom Routinelabor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg im Rahmen der Prävalenz-Studie durchgeführt. Die Anwesenheit des *mecA*-Gens, das letztendlich für die

Methicillin-Resistenz von *S. aureus* verantwortlich ist, wurde für alle *S. aureus*-Isolate, die im GeneOhm™ MRSA-Schnelltest positiv getestet wurden, überprüft. Verwendet wurden folgende Primer von Sigma-Aldrich, Taufkirchen.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)
mecA1	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	310
mecA2	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	

3.12 *spa*-Typisierung

Die *spa*-Typisierung ist eine Methode zur Untersuchung der klonalen Verwandtschaft von *S. aureus*-Isolaten. Sie basiert auf der Sequenzierung des Genabschnitts, der für einen hochvariablen Abschnitt des Protein A (Region X) codiert [131, 132], und dem anschließenden Vergleich der Sequenzen [46] (siehe Kapitel 1.2.3). Die *spa*-Typisierung der MRSA-Isolate wurde innerhalb der MRSA-Prävalenz-Studie durch das Routinelabor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt. Die *spa*-Typisierung der MSSA, die für einen dreimonatigen Kontrollzeitraum zusätzlich gesammelt wurden, erfolgte durch Johanna Priller aus der Arbeitsgruppe im Rahmen ihrer zahnmedizinischen Promotionsarbeit.

3.13 Based Upon Repeat Pattern (BURP)-Analyse

Die BURP-Analyse ist eine Methode zur Ermittlung und zur graphischen Darstellung der klonalen Verwandtschaft von *S. aureus*-Isolaten [48, 49]. Basierend auf der *spa*-Typisierung (siehe Kapitel 3.12) werden die *spa*-Typen in Abhängigkeit ihrer Übereinstimmung in der Region X sogenannten Klonalen Komplexen (auch als Cluster bezeichnet) zugeordnet. Diese Cluster können dann als Verknüpfung von einzelnen *spa*-Typen zweidimensional graphisch dargestellt werden.

Für die BURP-Analyse müssen folgende zwei Parameter definiert werden: Erstens die Anzahl an Repeats (x) der Region X des *spa*-Gens, ab der ein *spa*-Typ von der Analyse ausgeschlossen wird (für diese Analyse wurde $x \leq 5$ gewählt). Zu kurze *spa*-Gene werden wegen ihres limitierten Informationsgehaltes bezüglich der Evolution von *S. aureus* ausgeschlossen. Definiert wurde zweitens die Anzahl an genetischen Ereignissen wie Deletion,

Duplikation oder Punktmutation von Basen (y), die zwei *spa*-Typen maximal unterscheiden dürfen, sollen sie dem gleichen klonalen Komplex zugeordnet werden (für diese Analyse wurde $y \leq 4$ gewählt).

Die BURP-Analyse für die MRSA- und MSSA-Isolate dieser Studie wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Alexander Mellmann vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Münster durchgeführt.

3.14 Bestimmung der Hämolyseform

Zur Bestimmung der Hämolyseform wurden die Bakterien frisch aus der -80°C Stammsammlung auf Schafblutagar mit sterilen Einmalimpfösen ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien im Kühlschrank bei 4°C für weitere 24 Stunden gelagert (Kälte steigert die Aktivität des β -Hämolysins, siehe Kapitel 1.2.1). Am dritten Tag erfolgte nach dreistündiger Lagerung bei Raumluft die Begutachtung der Hämolyse am automatischen Kolonienzähler ProtoCOL (siehe 3.15). Zur Beurteilung der Hämolyse wurde eine weiße Filterplatte, Durchlicht und eine Belichtungszeit von 250 ms gewählt. Zur Beurteilung der Koloniemorphologie wurde eine schwarze Filterplatte, Auflicht und eine Belichtungszeit von 200 ms gewählt. Von jeder Einstellung wurde ein Bild aufgenommen und elektronisch gespeichert.

3.15 Geräte

Bilddokumentationsanlage:	Herolab UVT-28 MP, Herolab, Wiesloch
Brutschränke:	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer:	FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine:	Scotsman Ice Systems, Milan, Italien
Gelelektrophoresekammer:	Sub-Cell GT, Bio-Rad, München
Heizbad:	Memmert, Schwabach
Heizblock:	Labtherm, Liebisch, Bielefeld
Heizplatte für Magnetrührer:	MR 3001, Heidolph, Schwabach
Koloniezählgerät:	ProtoCOL, Synbiosis, Cambridge, England
Kühlschrank:	Liebherr, Ochsenhausen

Kühltruhe (-80°C):	ThermoForma, Fischer Scientific, Schwerte
Membranpumpe:	Typ 400057, Ilmvac, Ilmenau
Mikroskop:	Wilovert, Hund, Wetzlar
PCR-Cycler:	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen
Photometer:	U-2000, Hitachi Europe, Mannheim
Pipetten:	Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage:	Mettler-Toledo, Gießen
Schüttelinkubator:	New Brunswick, Eppendorf, Hamburg
Spannungsgeber:	PowerPac300, Bio-Rad, München
Spectrophotometer:	NanoDrop 1000, Peqlab, Erlangen
Sterilwerkbank:	Herasafe, Heraeus, Hanau Nuaire, Eurasburg
VITEK 2:	bioMérieux, Nürtingen
Vortexer:	L-46, Labinco, Breda, Niederlande
Zentrifugen:	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau

3.16 Statistische Auswertung

Die Daten der gemessenen zellulären Invasivität wurden durch den Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Die Homogenität der Varianzen von Vergleichsgruppen wurde mit dem Levene-Test überprüft. Für den Vergleich verschiedener *spa*- und *SCCmec*-Typen bezüglich ihres Potentials zellulärer Invasivität wurde als Generaltest, ob Unterschiede auf Typ-Ebene generell bestehen, eine einfaktorielle ANOVA angewandt. Bei signifikanter ANOVA wurden die einzelnen signifikanten Gruppenunterschiede durch den Scheffé-Post-hoc-Test ermittelt. Die übrigen statistischen Vergleiche von zwei Gruppen wurden mit einem T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Konnte kein parametrisches Testverfahren angewendet werden, wurden zwei Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test verglichen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ und $P < 0,01$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant bzw. hochsignifikant betrachtet.

Die statistische Analyse wurde mit der Software STATISTICA Version 9.1 (StatSoft GmbH, Hamburg) durchgeführt.

Der exakte Test nach Fischer fand als Signifikanztest auf Unabhängigkeit zweier Variablen Anwendung (für Kontingenztafeln mit bis zu 2x6 Feldern siehe <http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact.html>).

4 Ergebnisse

4.1 Prävalenz von *S. aureus* und MRSA

Die 109 MRSA-Isolate dieser Studie wurden im Rahmen einer MRSA-Prävalenz-Studie zwischen Juli 2007 und März 2008 am Universitätsklinikum der Universität Würzburg gesammelt [125] (siehe Kapitel 3.1). Die Prävalenz von MRSA über den gesamten Studienzeitraum betrug 2,79% (Tab. 1). In einem dreimonatigen Kontrollzeitraum wurden von September bis Dezember 2007 durch Johanna Priller aus der Arbeitsgruppe im Rahmen ihrer zahnmedizinischen Promotionsarbeit zusätzlich alle Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Isolate innerhalb der MRSA-Prävalenz-Studie gesammelt. Die Prävalenz von *S. aureus* im Kontrollzeitraum betrug 20,28%, die Prävalenz von MRSA ergab 2,28% und die MRSA-Rate von *S. aureus* errechnete sich mit 11,22% (Tab. 1). Die ermittelten Werte sprechen für eine ausreichende Sensitivität der verwendeten Screening-Methode innerhalb der Studie.

	Zeitraum	Fälle	Anzahl an <i>S. aureus</i> -Isolaten	
			MRSA	MSSA*
	17.07.07- 24.09.07	1127	40	
	25.09.07- 18.12.07	1494	34	269
	19.12.07- 17.03.08	1292	35	
Gesamt	8 Monate	3913	109	269 ¹
Prävalenz von <i>S. aureus</i>¹			Prävalenz von MRSA¹:	Prävalenz von MRSA²:
			2,28%	2,79%
			MRSA-Rate von <i>S. aureus</i>¹:	
			11,22%	

Tabelle 1. Prävalenz von MRSA im Studienzeitraum.

MRSA, Methicillin-resistenter *S. aureus*; MSSA, Methicillin-sensibler *S. aureus*;

*, MSSA nur während des Kontrollzeitraums zusätzlich durch Johanna Priller im Rahmen ihrer zahnmedizinischen Promotionsarbeit gesammelt;

¹, Kontrollzeitraum vom 25.09.07 bis zum 18.12.07;

², gesamter Studienzeitraum

4.2 SCC positive, *mecA* negative Isolate

Durch eine Kontrolle der Ergebnisse des GeneOhm™ MRSA-Schnelltests mit auf den Test folgender Kultivierung der Bakterien auf selektiven Nährmedien, Speziesidentifikation im VITEK 2, Agardiffusionstest und einer spezifischen *mecA*-PCR (siehe Kapitel 3.1) wurden im Studienzeitraum 28 durch den MRSA-Schnelltest primär als MRSA erkannte Isolate, im weiteren Verlauf als Methicillin-sensibel und *mecA*-negativ identifiziert (Abb. 6). Der Positive Prädiktive Wert des MRSA-Schnelltest fiel deshalb mit 0,636 suboptimal aus [125].

Diese Isolate tragen Reste der SCC-Kassette (siehe Kapitel 1.2.5) in ihrem Genom, in der das für die Methicillin-Resistenz verantwortliche *mecA*-Gen fehlt.

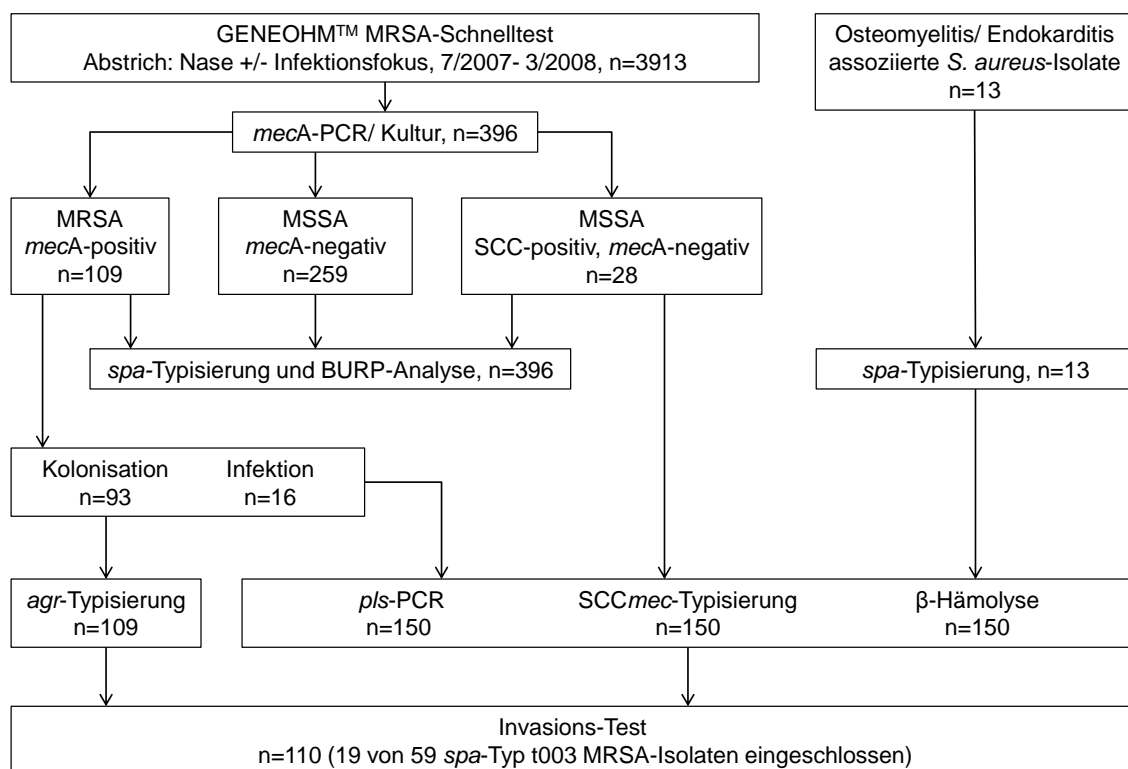


Abbildung 6. Flussdiagramm zur Analyse der Studienisolate. Die Verknüpfung durch Pfeile zeigt, welchen Arbeitsschritten die jeweilige Gruppe an Isolaten zugeführt wurde. Die Anzahl der betreffenden Isolate ist in jedem Rechteck zusätzlich angegeben. Neben den Isolaten aus der MRSA-Prävalenz-Studie wurden 13 mit Osteomyelitis bzw. Endokarditis assoziierte *S. aureus*-Isolate als externe Referenzgruppe mitgeführt. Die Sammlung und *spa*-Typisierung der 259 Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Isolate eines dreimonatigen Kontrollzeitraums erfolgte durch Johanna Priller aus der Arbeitsgruppe im Rahmen ihrer zahnmedizinischen Promotionsarbeit.

Deshalb wurden sie durch den verwendeten MRSA-Schnelltest, der die SCC-Kassette nicht aber das *mecA*-Gen selbst detektiert, fälschlicherweise als MRSA identifiziert.

SCC positive und *mecA* negative (SCC⁺/*mecA*⁻) Staphylokokken wurden in der Literatur bereits allgemein [133, 134] und im Besonderen bei Verwendung des GeneOhm™ MRSA-Schnelltests [135] beschrieben. Für die weitere Auswertung wurden die SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate als MSSA geführt. Insgesamt 10 der SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate gehörten zu den 269 MSSA, die während des dreimonatigen Kontrollzeitraums gesammelt wurden. Die anderen 18 SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate wurden außerhalb dieses Kontrollzeitraums isoliert.

Die *spa*-Typ-Verteilung unter den SCC⁺/*mecA*⁻-Isolaten stellte sich wie folgt dar: Mit 10 Isolaten war *spa*-Typ t127 am häufigsten. Darauf folgten die *spa*-Typen t003 und t008 mit je 3 Isolaten, Typ t002 mit 2 Isolaten und die Typen t056, t362, t559, t589, t888, t1491, t1931, t2814, t3174 und t3176 mit je einem Isolat.

In Abb. 7 ist ein Vergleich der *spa*-Typ-Verteilung von SCC⁺/*mecA*⁻- und MRSA-Isolaten der Prävalenz-Studie dargestellt.

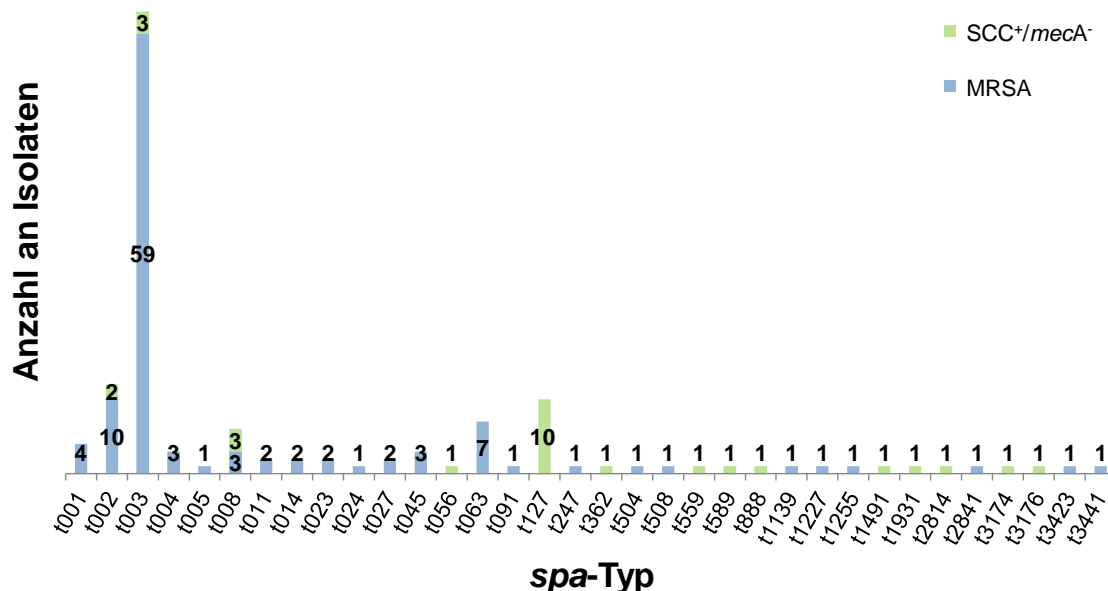


Abbildung 7. Vergleich der *spa*-Typ-Verteilung von 109 MRSA- und den 28 SCC⁺/*mecA*⁻-Isolaten der Prävalenz-Studie. Die *spa*-Typen sind in ansteigender Reihenfolge sortiert. Die Anzahl an Isolaten ist über bzw. innerhalb der jeweiligen Säule angegeben. Wenn ein *spa*-Typ MRSA- und SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate enthält sind die Anzahl an jeweiligen Isolaten als gestapelte Säulen dargestellt, wobei die Säule für MRSA-Isolate blau gefärbt und die Säule für SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate grün gefärbt ist.

	<i>spa</i> -Typ						Gesamt	
	t003	t002	t127	t063	t008	Andere		
Beobachtete	59	10	0	7	3	30	109	MRSA
Verteilung	3	2	10	0	3	10	28	SCC⁺/mecA⁻
Erwartete	49,3	9,5	8,0	5,6	4,8	31,8	109	MRSA
Verteilung	12,7	2,5	2,0	1,4	1,2	8,2	28	SCC⁺/mecA⁻
Gesamt	62	12	10	7	6	40	137	

Irrtumswahrscheinlichkeit einer ungleichen Verteilung: **P < 0,01**

Tabelle 2. Die *spa*-Typ-Verteilung von SCC⁺/*mecA*⁻- und MRSA-Isolaten unterscheidet sich hochsignifikant (Exakter Test nach Fischer). Verglichen wird die Frequenz der häufigsten *spa*-Typen beider Gruppen. Bei den SCC⁺/*mecA*⁻-Isolaten werden alle *spa*-Typen mit mehr als einem Isolat einzeln aufgeführt, bei den MRSA sind die drei häufigsten *spa*-Typen und Typ t008 einzeln aufgeführt. Die jeweils anderen *spa*-Typen werden unter „Andere“ zusammengefasst.

Die *spa*-Typ-Verteilung der SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate unterschied sich hochsignifikant (P < 0,01, Exakter Test nach Fischer) von den MRSA der Studie (Tab. 2).

Bezüglich ihrer zellulären Invasivität unterschieden sich die 28 SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate (Mittelwert 107%, Median 103%, Bereich von 32% bis 228%) nicht von den 69 Invasions-getesteten MRSA (Mittelwert 98%, Median 101%, Bereich von 22% bis 200%) der Studie (T-Test, P = 0,285; die Daten der ermittelten Invasivität waren normalverteilt und die Varianzen homogen).

Von 28 SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate waren 24 Isolate wie erwartet nicht durch die SCC*mec*-PCR typisierbar und negativ für das *pls*-Gen. 3 SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate wurden allerdings durch die SCC*mec*-PCR als Typ I-Isolate identifiziert und waren negativ für das *pls*-Gen. Ein SCC⁺/*mecA*⁻-Isolat wurde durch die SCC*mec*-PCR als Typ I-Isolat identifiziert und war zusätzlich positiv für das *pls*-Gen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Isolate jeweils unterschiedliche Abschnitte im Bereich der SCC*mec*-Kassette verloren haben. Für eine genaue Analyse wäre die Sequenzierung der betreffenden Kassette notwendig.

4.3 Molekulare Charakterisierung der Studienstämme

Alle Isolate dieser Studie wurden *spa*-typisiert. Die 109 MRSA, 28 SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate und die 13 Isolate der externen Referenzgruppe wurden zusätzlich SCC*mec*-typisiert, auf Anwesenheit des *pIs*-Gens überprüft und bezüglich ihrer Hämolyseform beurteilt. Die 109 MRSA wurden darüber hinaus *agr*-typisiert. Eine Übersicht aller Charakteristika gibt Tab. 5 im Anhang. Im Folgenden werden die zur MRSA-Prävalenz-Studie gehörigen Isolate besprochen. Bei der *spa*-Typisierung der 109 MRSA (Abb. 8) wurden insgesamt 23 verschiedene *spa*-Typen identifiziert. 16 *spa*-Typen umfassten zwei oder weniger Isolate. Mit deutlichem Abstand am häufigsten war Typ t003 mit 59 Isolaten (54% aller Isolate). Es folgten Typ t002 mit 10 Isolaten (9%), Typ t063 mit 7 Isolaten (6%), Typ t001 mit 4 Isolaten (4%) und die Typen t004, t008 und t045 mit jeweils 3 Isolaten (jeweils 3%). Die *spa*-Typ t003 Isolate scheinen einem endemischen Klon (t003/ST225/SCC*mec* II) anzugehören, der mit einem Radius von 400km um ein gedachtes Zentrum in Sachsen gehäuft auftritt [136].

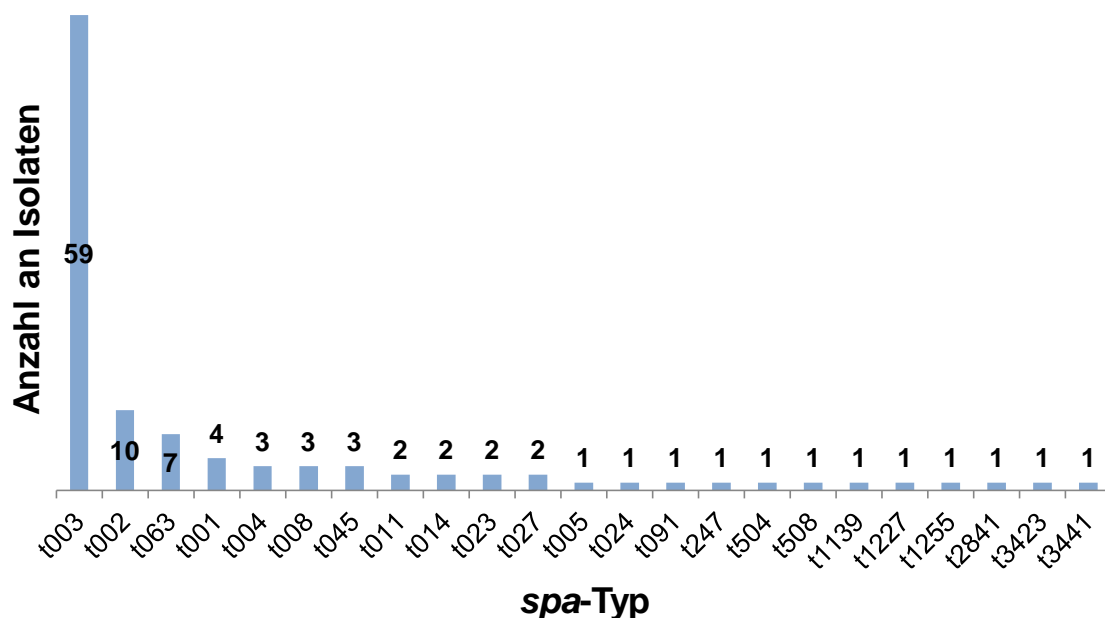


Abbildung 8. *spa*-Typ-Verteilung unter den 109 MRSA-Isolaten der Prävalenz-Studie. Die *spa*-Typen sind nach Anzahl der enthaltenen Isolate in absteigender Reihenfolge sortiert. Die Anzahl an Isolaten, die ein *spa*-Typ enthält, ist über bzw. innerhalb der jeweiligen Säule angegeben. Auffällig ist die Frequenz von *spa*-Typ t003, der mit 54% aller Isolate sehr häufig war.

Mithilfe einer *SCCmec*-Multiplex-PCR [129] wurden unter den 109 MRSA der Studie 5 verschiedene *SCCmec*-Typen identifiziert (Abb. 9). Ein Isolat zeigte wiederholt ein Bandenmuster, das keinem der *SCCmec*-Typen I bis V zugeordnet werden konnte, und wurde als nicht-typisierbar (NT) klassifiziert. Unter 108 MRSA-Isolaten war *SCCmec*-Typ II am häufigsten mit 81 Isolaten (74% aller Isolate), gefolgt von Typ IV mit 16 Isolaten (15%), Typ I mit 6 Isolaten (6%), Typ V mit 4 Isolaten (4%) und Typ III mit einem Isolat (1%). Von 109 MRSA, die durch eine spezifische PCR auf die Anwesenheit des *pIs*-Gens getestet wurden, waren 6 Isolate positiv für *pIs* (6% der Isolate). Wie erwartet trugen alle *pIs*-positiven Isolate die *SCCmec*-Kassette vom Typ I, da das *pIs*-Gen (fast) exklusiv mit diesem *SCCmec*-Typ assoziiert ist. Kürzlich wurde in einer Studie erstmalig ein *pIs*/*Pls*-positives MRSA-Isolat mit *SCCmec*-Typ IV identifiziert [39]. Die 6 *pIs*-positiven Isolate dieser Studie gehörten zu den *spa*-Typen t001 (4 Isolate) oder t023 (2 Isolate).

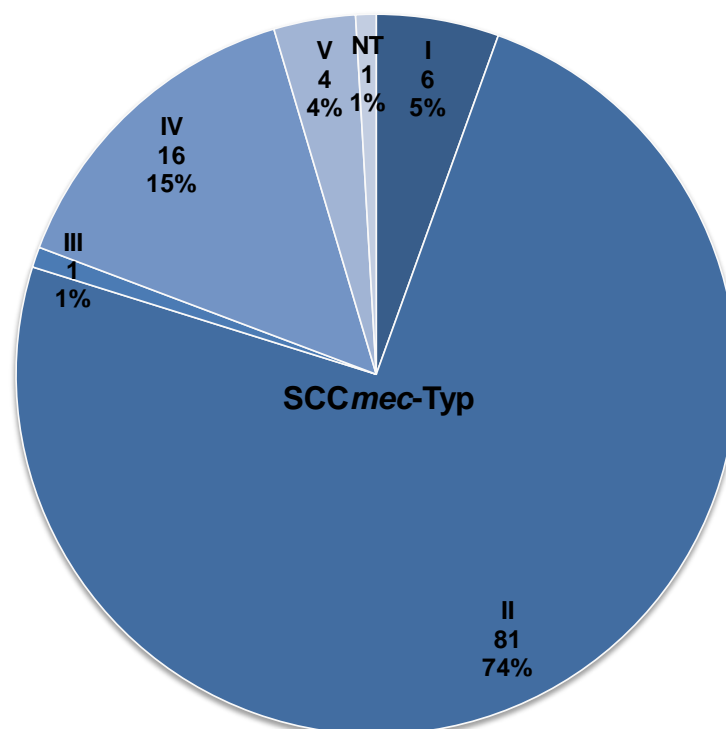


Abbildung 9. *SCCmec*-Typ-Verteilung unter den 109 MRSA-Isolaten der Prävalenz-Studie. In der Abbildung sind in vertikaler Anordnung jeweils der *SCCmec*-Typ, die Anzahl an enthaltenen Isolaten und der prozentuale Anteil an allen MRSA-Isolaten aufgeführt (von oben beginnend). Alle *pIs*-positiven MRSA-Isolate der Studie gehören zum *SCCmec*-Typ I. NT, nicht typisierbar.

Die *agr*-Typisierung der 109 MRSA differenzierte die Studienisolate in drei unterschiedliche *agr*-Typen (Typ I bis III; Abb. 10). Typ IV wurde unter den Studienisolaten nicht identifiziert. Am häufigsten wurde *agr*-Typ II mit 86 Isolaten (79% aller Isolate) gefunden, gefolgt von *agr*-Typ I mit 22 Isolaten (20%) und *agr*-Typ III mit einem Isolat (1%).

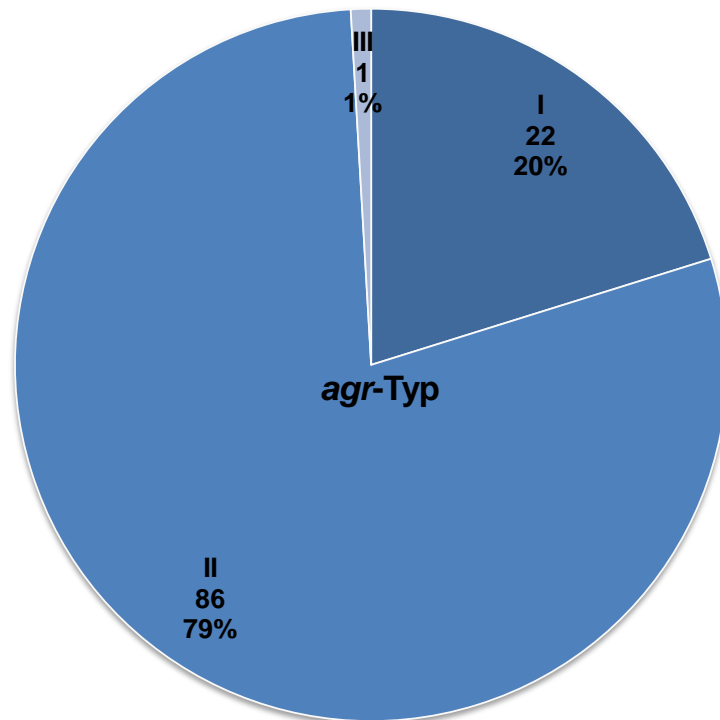


Abbildung 10. *agr*-Typ-Verteilung unter den 109 MRSA-Isolaten der Prävalenz-Studie. In der Abbildung sind in vertikaler Anordnung jeweils der *agr*-Typ, die Anzahl an enthaltenen Isolaten und der prozentuale Anteil an allen MRSA-Isolaten aufgeführt (von oben beginnend). Es wurde kein Isolat vom *agr*-Typ IV identifiziert.

4.4 Based Upon Repeat Pattern (BURP)-Analyse

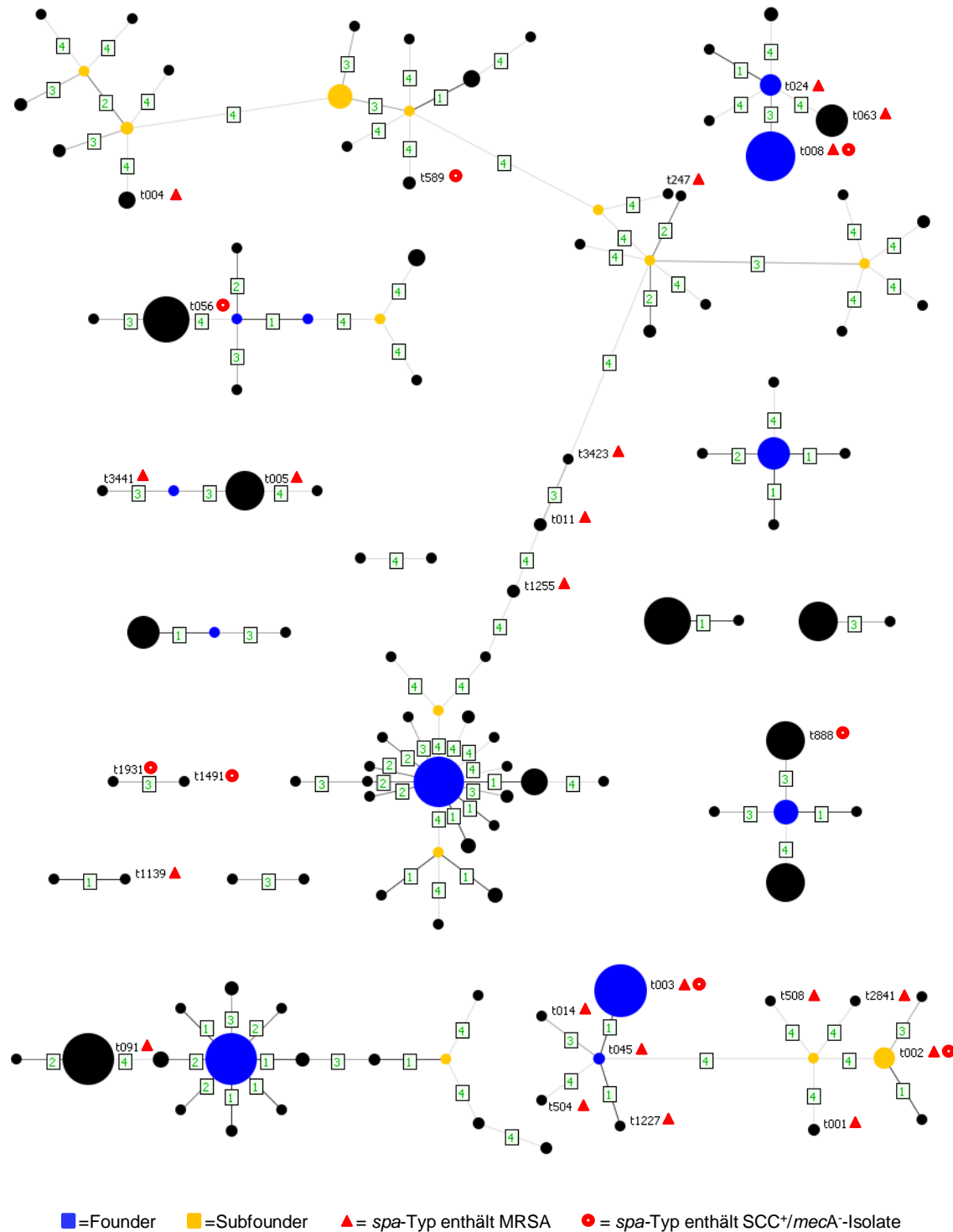
In die BURP-Analyse zur Ermittlung und graphischen Darstellung verwandter *spa*-Typen (siehe Kapitel 3.13) wurden 109 MRSA, 269 MSSA (inkl. 10 SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate, siehe Kapitel 4.2) und 18 SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate, die außerhalb der dreimonatigen Kontrollzeitraums gesammelt wurden, eingeschlossen. Die Analyse ergab für diese Population 15 verschiedene Cluster. Diese 15 Cluster enthielten 125 (84%) aller *spa*-Typen mit 352 Isolaten. Weiterhin fanden sich 14 (9%) unverbundene *spa*-Typen (sogenannte Singletons) mit 25 Isolaten. 13 (9%) *spa*-Typen mit 17 Isolaten wurden von der Analyse ausgeschlossen, wegen unzureichender Anzahl an Repeats in der Region X des *spa*-Gens. Zwei MSSA waren nicht *spa*-typisierbar und sind deshalb nicht berücksichtigt.

Von 109 MRSA befanden sich 105 Isolate von 21 *spa*-Typen in 6 verschiedenen Clustern, ein *spa*-Typ mit 2 Isolaten wurde als Singleton nicht dargestellt und ein weiterer *spa*-Typ mit zwei Isolaten wurde von der Analyse ausgeschlossen.

Die BURP-Analyse verdeutlicht die höhere genetische Diversität von MSSA im Vergleich zu MRSA. MRSA zeigen ein gehäuftes Vorkommen in wenigen *spa*-Typen verglichen mit MSSA. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch eine aktuelle Studie von Grundmann et al. [136]. Die BURP-Analyse ist in Abb. 11 dargestellt.

Abbildung 11. Gezeigt wird die Populationsstruktur der Studienisolate durch BURP-Analyse. Insgesamt wurden 109 MRSA, 269 MSSA (inkl. 10 SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate) und 18 weitere SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate eingeschlossen. *spa*-Typen, die MRSA oder SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate enthalten, sind durch rote Dreiecke bzw. rote Kreise separat gekennzeichnet. Jeder Punkt repräsentiert einen *spa*-Typ. Der Durchmesser eines Punktes ist proportional zur Anzahl der enthaltenen Isolate. Blaue Punkte stellen sogenannte „Founder“ dar, also *spa*-Typen, die jeweils die meisten nahen Verwandten innerhalb eines Clusters und somit den höchsten Founder-Wert aufweisen. Gelbe Punkte stellen sogenannte „Subfounder“ dar, also *spa*-Typen mit dem zweithöchsten Founder-Wert. Die Zahlen in den Kästchen auf den Verbindungslinien zeigen die Anzahl an genetischen Events wie z.B. Deletion, Duplikation oder Mutation von Basen an, die die verbundenen *spa*-Typen unterscheiden. Die Länge oder Richtung der Verbindungslinien enthält keine Information über die genetische Verwandtschaft zwischen zwei *spa*-Typen. Die *spa*-Typisierung der MSSA für die Analyse erfolgte durch Johanna Priller aus der Arbeitsgruppe im Rahmen ihrer zahnmedizinischen Promotionsarbeit. In dieser Abbildung sind nur die mit MRSA- bzw. SCC⁺/*mecA*⁻-

Isolaten assoziierten *spa*-Typen gekennzeichnet. Die vollständige Abbildung der BURP-Analyse mit detaillierter Bezeichnung aller *spa*-Typen ist in der Promotionsarbeit von Johanna Priller bzw. in der zu dieser Arbeit gehörigen Publikation [137] dargestellt. Die BURP-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Alexander Mellmann vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Münster durchgeführt.



4.5 β -Hämolyse und zelluläre Invasivität

Die Produktion von Hämolsinen durch die MRSA-Isolate der Studie wurde auf Schafblutagar untersucht (siehe Kapitel 3.14 bzw. Abb. 12) und auf Korrelation mit der zellulären Invasivität überprüft.

Die Daten der ermittelten zellulären Invasivität waren zwar normalverteilt, allerdings konnte keine Homogenität der Varianzen nachgewiesen werden. Der Vergleich beider Gruppen erfolgte deshalb mit dem Mann-Whitney U-Test. MRSA-Isolate, die keine β -Hämolyse zeigten (Mittelwert 67%, Median 50%, Bereich von 22% bis 144%), waren weniger invasiv verglichen mit den hämolysierenden Isolaten der Studie (Mittelwert 108%, Median 111%, Bereich von 37% bis 200%; $P = 0,002$; Abb. 13).

Allerdings gehörten zu den nicht-hämolysierenden Isolaten alle 6 *p/s*-positiven Isolate der Studie, die ein geringes Potential zellulärer Invasivität aufweisen [39-41]. Das geringe Potential zellulärer Invasivität der nicht-hämolysierenden Isolate könnte also durch diese 6 *p/s*-positiven Isolate maßgeblich beeinflusst worden sein. Werden die 6 *p/s*-positiven Isolate von der Analyse ausgeschlossen, errechnet sich ein statistisch nicht signifikanter P-Wert von 0,161 (Abb. 13).



Abbildung 12. Verschiedene Ausprägungen der β -Hämolyse am Beispiel von drei ausgewählten Isolaten der Studie. Gezeigt sind keine β -Hämolyse (links, BS624), einfache β -Hämolyse (Mitte, BS628) und doppelte β -Hämolyse (rechts, BS590). Für die Korrelation mit der zellulären Invasivität wurde nur zwischen hämolysierenden und nicht-hämolysierenden Isolaten unterschieden.

Würde die fehlende Homogenität der Varianzen nicht berücksichtigt und beide Gruppen mit dem T-Test verglichen, wäre der Unterschied beider Gruppen bezüglich der zellulären Invasivität sowohl unter Berücksichtigung der *pls*-positiven Isolate ($P < 0,001$) als auch unter Ausschluss der *pls*-positiven Isolate ($P = 0,015$) von der Analyse statistisch signifikant.

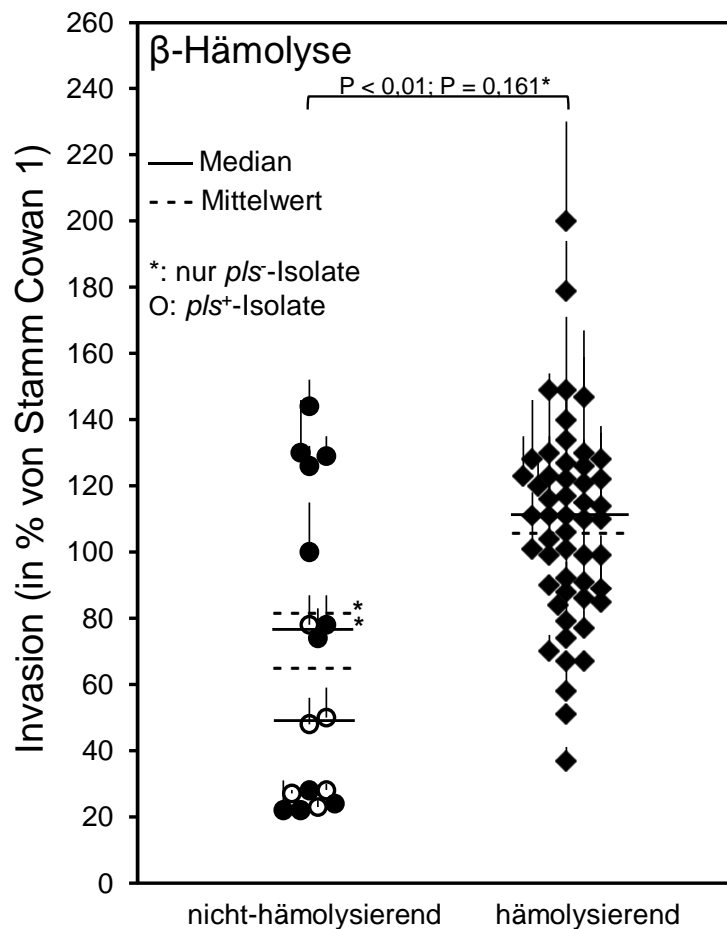


Abbildung 13. Korrelation von β -Hämolyse und zellulärer Invasivität. Werden die *pls*-positiven Isolate in die Analyse eingeschlossen zeigen sich nicht-hämolisierende Isolate hochsignifikant geringer invasiv ($P < 0,01$, Mann-Whitney U-Test). Werden die *pls*-positiven Isolate von der Analyse ausgeschlossen errechnet sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der zellulären Invasivität zwischen den beiden Gruppen ($P = 0,161$). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von drei unabhängigen, in Duplikaten durchgeführten Experimenten. Die Invasivität ist dabei relativ angegeben, verglichen mit Stamm Cowan 1 (=100%). Durchgezogene Linien entsprechen der medianen Invasivität jeder Gruppe; gestrichelte Linien entsprechen dem Mittelwert der Invasivität jeder Gruppe. Die *pls*-positiven Isolate sind durch offene Symbole markiert.

Die Produktion von Hämolsinen und die Expression von FnBPs, die entscheidenden Einfluss auf die zelluläre Invasivität von *S. aureus* haben, sind über den *agr*-Genregulator invers reguliert (siehe Kapitel 1.2.4).

Nicht-hämolysierende Isolate, die gleichzeitig ein geringes Potential zellulärer Invasivität aufweisen, wären nach diesem Modell nicht zu erwarten. Insofern scheint die Erklärung der geringen Invasivität der nicht-hämolysierenden Studienisolate durch die Anwesenheit des *pIs*-Gens kongruent. Allerdings bleiben die nicht-hämolysierenden Isolate selbst nach Ausschluss der *pIs*-positiven Isolate von der statistischen Analyse durchschnittlich geringer invasiv. Dies stellt einen Widerspruch zum gängigen Regulator-Modell dar.

4.6 Molekulare Marker korrelieren mit zellulärer Invasivität

Die Korrelation der molekularen Marker *agr*-Typ, *spa*-Typ, *SCCmec*-Typ und die Anwesenheit des *pls*-Gens mit der zellulären Invasivität wurden untersucht. Für eine Darstellung dieser Korrelationen siehe Abb. 14.

Die ermittelten Werte für die zelluläre Invasivität waren normalverteilt und die Varianzen unter allen Gruppen der folgenden Vergleiche homogen. Da die MRSA-Isolate des *spa*-Typs t003 einen überproportional großen Anteil an der Studienpopulation hatten, wurden 19 der 59 Isolate (32% aller *spa*-Typ t003) auf ihr Potential zellulärer Invasivität getestet (Abb. 6).

Die Isolate des *agr*-Typs I (Mittelwert 116%, Median 125%, Bereich von 37% bis 200%) und des *agr*-Typs II (Mittelwert 89%, Median 96%, Bereich von 22% bis 149%) unterschieden sich signifikant (T-Test, $P = 0,004$; der *agr*-Typ III mit einem Isolat wurde von der Analyse ausgeschlossen), wobei die Isolate des *agr*-Typs I eine höhere Invasivität zeigten.

MRSA-Isolate der *spa*-Typen t001 zeigten eine besonders geringe und Isolate der *spa*-Typen t008 und t063 eine besonders hohe Invasivität. Statistisch unterschieden sich folgende *spa*-Typ-Gruppen signifikant (ANOVA, $P < 0,01$; für die statistische Analyse wurden nur *spa*-Typen mit ≥ 3 Isolaten berücksichtigt): Isolate des *spa*-Typs t001 (Mittelwert 51%, Median 49%, Bereich von 27% bis 78%) versus Isolate des *spa*-Typs t008 (Mittelwert 142%, Median 147%, Bereich von 129% bis 149%; Scheffé-Test, $P = 0,032$). Isolate des *spa*-Typs t001 versus Isolate des *spa*-Typs t063 (Mittelwert 146%, Median 130%, Bereich von 123% bis 200%; Scheffé-Test, $P = 0,002$) und Isolate des *spa*-Typs t002 (Mittelwert 82%, Median 96%, Bereich von 22% bis 126%) versus Isolate des *spa*-Typs t063 (Scheffé-Test, $P = 0,014$). Die geringe Invasivität der Isolate des *spa*-Typs t001 kann durch die Anwesenheit des *pls*-Gens erklärt werden.

MRSA-Isolate der *SCCmec*-Typen I und V zeigten eine besonders geringe und Isolate des *SCCmec*-Typs IV zeigten eine besonders ausgeprägte Invasivität. Statistisch unterschieden sich folgende *SCCmec*-Typ-Gruppen signifikant (ANOVA, $P < 0,01$; der *SCCmec*-Typ III mit einem Isolat und ein nicht-typisierbares Isolat wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen):

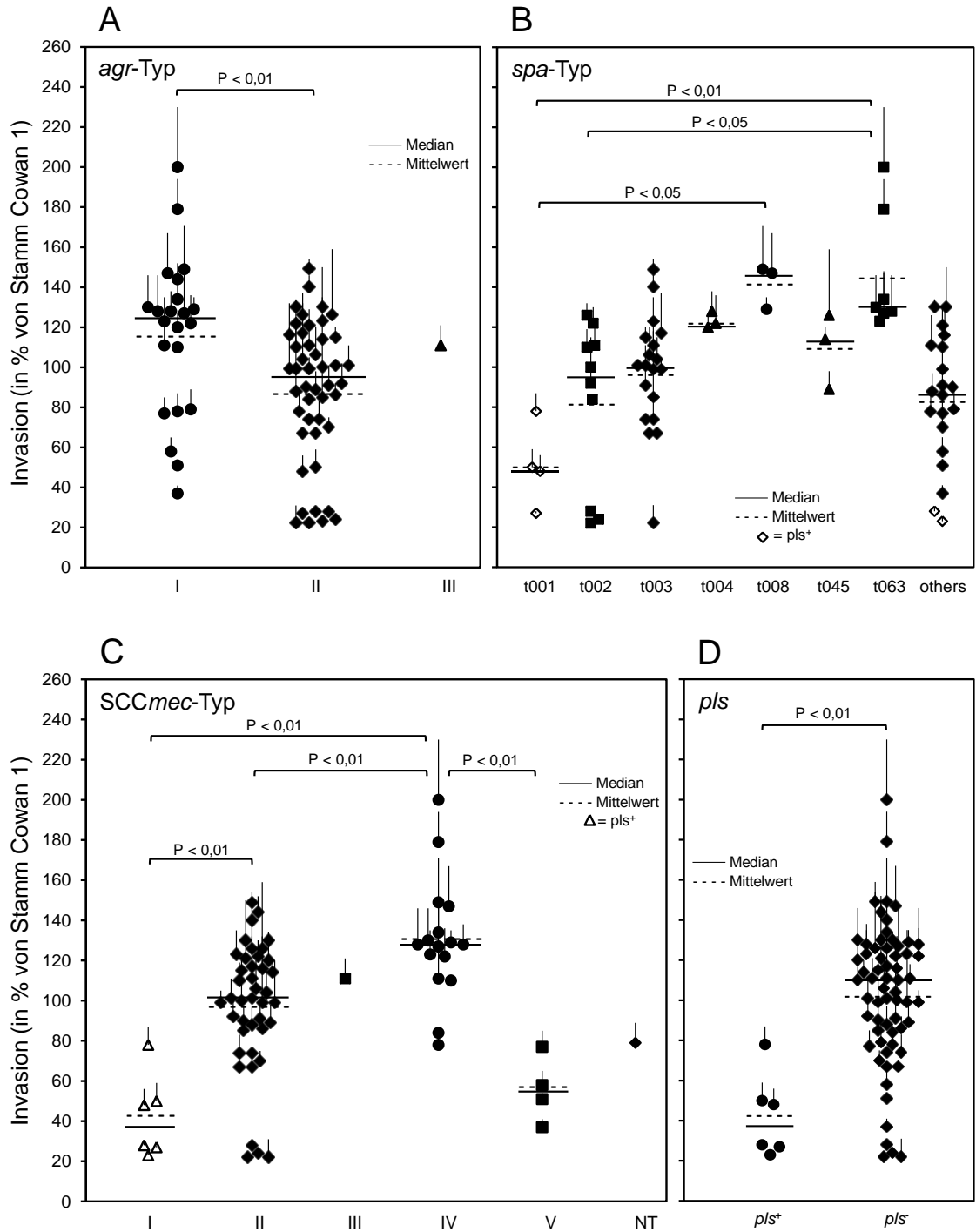
Isolate des SCC*mec*-Typs I (Mittelwert 42%, Median 38%, Bereich von 23% bis 78%) versus Isolate des SCC*mec*-Typs II (Mittelwert 97%, Median 101%, Bereich von 22% bis 144%; Scheffé-Test, P = 0,001). Isolate des SCC*mec*-Typs I versus Isolate des SCC*mec*-Typs IV (Mittelwert 130%, Median 128%, Bereich von 78% bis 200%; Scheffé-Test, P = 0,000). Isolate des SCC*mec*-Typs II versus Isolate des SCC*mec*-Typs IV (Scheffé-Test, P = 0,006) und Isolate des SCC*mec*-Typs IV versus Isolate des SCC*mec*-Typs V (Mittelwert 56%, Median 55%, Bereich von 37% bis 77%; Scheffé-Test, P = 0,007). Alle Isolate des SCC*mec*-Typs I waren *pIs*-positiv und zeigten somit ein geringeres Potential zellulärer Invasivität.

Die 6 *pIs*-positiven MRSA-Isolate waren wie erwartet weniger invasiv (Mittelwert 42%, Median 38%, Bereich von 23% bis 78%) als die *pIs*-negativen Isolate (Mittelwert 103%, Median 125%, Bereich von 22% bis 200%; T-Test, P = 0,000). Die bekannten molekularen Marker zellulärer Invasivität (SCC*mec*-Typ, *spa*-Typ, *pIs*) [39-41] zeigen sich in dieser Studie reproduzierbar und lassen sich auch auf vorher nicht beschriebene SCC*mec*- und *spa*-Typen ausweiten.

Im Vergleich zu den bisherigen Studien wurde ihre Verlässlichkeit hier für eine klinische MRSA-Population gezeigt.

Des Weiteren konnte in dieser Studie eine Korrelation von *agr*-Typ und zellulärer Invasivität gefunden werden. Der *agr*-Typ scheint also ein weiterer molekularer Marker zellulärer Invasivität zu sein.

Abbildung 14. Gezeigt wird die Korrelation der molekularen Marker *agr*-Typ (A), *spa*-Typ (B), SCC*mec*-Typ (C) und Anwesenheit des *pIs*-Gens (D) mit der *in vitro* gemessenen zellulären Invasivität. Der statistische Gruppenvergleich erfolgte mit dem T-Test (für *agr*-Typ und *pIs*) bzw. mit ANOVA/ Scheffé-Test (für *spa*- und SCC*mec*-Typ). Die P-Werte sind in jeder Abbildung angegeben. Die Ergebnisse des Invasions-Tests sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) von drei unabhängigen, in Duplikaten durchgeführten Experimenten. Die Invasivität ist dabei relativ angegeben, verglichen mit Stamm Cowan 1 (=100%). Durchgezogene Linien entsprechen der medianen Invasivität jeder Gruppe, gestrichelte Linien entsprechen dem Mittelwert der Invasivität jeder Gruppe. NT, nicht typisierbar. Die *pIs*-positiven Isolate sind durch offene Symbole markiert (*spa*- und SCC*mec*-Typ).



4.7 Die Etablierung einer Infektion ist unabhängig von der zellulären Invasivität

16 von 109 MRSA-Isolaten der Studie waren assoziiert mit einer klinischen Infektion. Die anderen 93 MRSA-Isolate waren Kolonisierer (Abb. 6). Die Assoziation mit einer klinischen Infektion wurde von ärztlichen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie im Rahmen der MRSA-Prävalenz-Studie evaluiert und nachverfolgt. Für die weitere Analyse wurden jeweils die Isolate verwendet, die vom Infektionsfokus entnommen worden waren. Die Übereinstimmung des Isolats vom Nasenabstrich mit dem des Infektionsfokus wurde durch den Vergleich molekularer Marker (*spa*-Typ) sowie des Resistenzmusters gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika im Agardiffusionstest sicher gestellt.

Infektions-assoziierte MRSA-Studienisolate			Externe Referenzgruppe		
Alter (Jahre)	M/W	Diagnose	Alter (Jahre)	M/W	Diagnose
43	W	Sepsis	25	W	Endokarditis
60	W	Oberflächliche Wundinfektion	37	W	Osteomyelitis
62	W	Oberflächliche Weichteilinfektion	52	W	Osteomyelitis
62	W	Oberflächliche Weichteilinfektion	52	W	Osteomyelitis
70	W	Oberflächliche Wundinfektion	56	W	Osteomyelitis
71	W	Tiefe Wundinfektion	38	M	Osteomyelitis
74	W	Infektion der Mundhöhle	61	M	Osteomyelitis
75	W	Gelenkinfektion	62	M	Osteomyelitis
76	W	Oberflächliche Weichteilinfektion	70	M	Osteomyelitis
90	W	Infektion der Mundhöhle	70	M	Osteomyelitis
54	M	Tiefe Wundinfektion	72	M	Osteomyelitis
63	M	Pneumonie	74	M	Osteomyelitis
71	M	Pneumonie, Sepsis	78	M	Osteomyelitis
75	M	Katheter-assoziierte Infektion			
81	M	Harnwegsinfektion			
84	M	Oberflächliche Weichteilinfektion			
Alter (Median): 71 Jahre; F:M, 10:6; n=16			Alter (Median): 61 Jahre; F:M, 5:8; n=13		

Tabelle 3. Dargestellt werden Alter, Geschlecht und Diagnose der 16 Patienten aus dem Bereich der MRSA-Prävalenz-Studie und der 13 Patienten der externen Referenzgruppe, von denen die Infektions-assoziierten Isolate dieser Arbeit stammen.

Als externe Referenzgruppe für *S. aureus*-Isolate, die klinisch mit vergleichsweise invasiven Infektionen assoziiert sind, wurden 13 Osteomyelitis- bzw. Endokarditis-assoziierte *S. aureus*-Isolate aus der Stammsammlung des Routinelabors übernommen und charakterisiert (siehe Kapitel 3.1, Abb. 6 und Tab.3).

Tab. 4 gibt Auskunft über die Patienten und die jeweiligen mit *S. aureus* assoziierten Infektionen der 16 MRSA-Prävalenz-Studie-Isolate und der 13 externen Referenzisolate.

Die ermittelten Werte für die zelluläre Invasivität waren normalverteilt und die Varianzen unter den jeweiligen Vergleichsgruppen homogen.

Die mediane zelluläre Invasivität der 16 Infektions-assoziierten Studienisolate (Mittelwert 89%, Median 108%, Bereich von 22% bis 147%) war zwar etwas höher, allerdings nicht signifikant erhöht im Vergleich zu den kolonisierenden Studienisolaten (Mittelwert 100%, Median 100%, Bereich von 22% bis 200%; T-Test, $P = 0,286$). Die 13 Isolate der externen Referenzgruppe (Mittelwert 109%, Median 110%, Bereich von 34% bis 156%) zeigten im Wesentlichen die gleiche mediane Invasivität wie die Infektions-assoziierten Studienisolate und waren statistisch nicht signifikant verschieden zu den kolonisierenden Studienisolaten (T-Test, $P = 0,472$). Die *in vitro* gemessene Invasivität klinischer MRSA-Isolate vermag also nicht zwischen kolonisierenden und Infektions-assoziierten Isolaten zu unterscheiden und scheint somit unabhängig von der Etablierung einer Infektion *in vivo*. Den Vergleich der drei Gruppen zeigt Abb. 15.

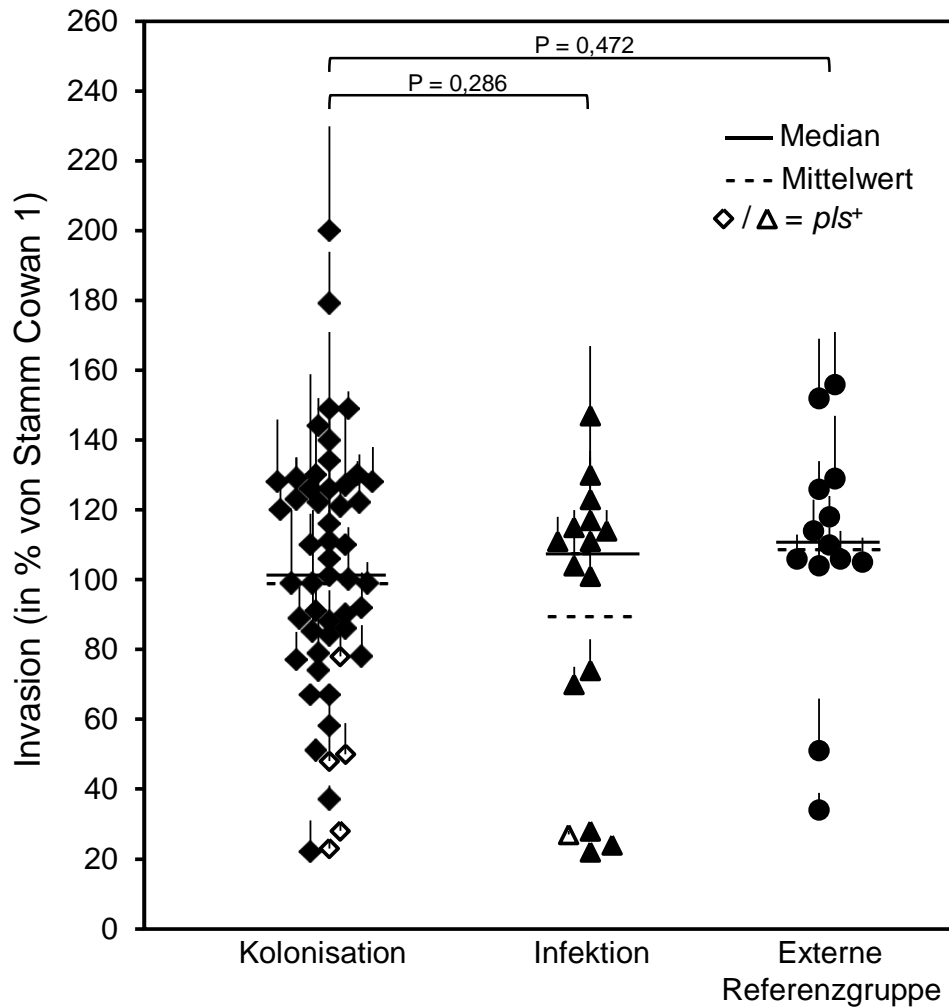


Abbildung 15. Vergleich der zellulären Invasivität von kolonisierenden (links) und 16 Infektions-assoziierten (Mitte) MRSA-Studienisolaten. Die externe Referenzgruppe (rechts) besteht aus 13 mit Osteomyelitis bzw. Endokarditis assoziierten *S. aureus*-Isolaten, die formal nicht aus dem Bereich der MRSA-Prävalenz-Studie stammen. Der statistische Vergleich zweier Gruppen erfolgte mit dem T-Test. Die P-Werte sind in der Abbildung angegeben. Die Ergebnisse des Invasions-Tests sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) von drei unabhängigen, in Duplikaten durchgeführten Experimenten. Die Invasivität ist dabei relativ angegeben, verglichen mit Stamm Cowan 1 (=100%). Durchgezogene Linien entsprechen der medianen Invasivität jeder Gruppe, gestrichelte Linien entsprechen dem Mittelwert der Invasivität jeder Gruppe. Die *plS*-positiven Isolate sind durch offene Symbole markiert.

4.8 Die Etablierung einer Infektion ist unabhängig vom *spa*- und *agr*-Typ

Um zu analysieren, ob molekulare Marker der zellulären Invasivität wie der *spa*- oder der *agr*-Typ das Potential eines MRSA-Isolats für die Etablierung einer klinischen Infektion vorherzusagen vermögen, wurde der Exakte Test nach Fischer angewandt. Geprüft wurde, ob sich die Verteilung von *spa*- und *agr*-Typen zwischen kolonisierenden und Infektions-assoziierten Isolaten überzufällig unterscheidet. Das Ergebnis des Tests wurde als P-Wert angegeben.

Weder für den *spa*-Typ ($P = 0,148$) noch für den *agr*-Typ ($P = 0,076$) konnte ein überzufälliger Unterschied in der Verteilung zwischen kolonisierenden und Infektions-assoziierten MRSA-Isolaten nachgewiesen werden (Tab. 4).

	<i>spa</i> -Typ						<i>agr</i> -Typ			Total	
	t003	t002	t063	t001	n=3	n≤2	I	II	III		
Beobachtete Verteilung	7	4	0	1	2	2	1	14	1	16	Infektion
	52	6	7	3	7	18	21	72	0	93	Kolonisation
Erwartete Verteilung	8.7	1.5	1.0	0.6	1.3	2.9	3.2	12.6	0.2	16	Infektion
	50.3	8.5	6.0	3.4	7.7	17.1	18.8	73.4	0.8	93	Kolonisation
Total	59	10	7	4	9	20	22	86	1	109	
Irrtumswahrscheinlichkeit einer ungleichen Verteilung:											
P = 0,148						P = 0,076					

Tabelle 4. Vergleich der Häufigkeit von verschiedenen *spa*- und *agr*-Typen unter den kolonisierenden und Infektions-assoziierten MRSA-Studienisolaten mit dem exakten Test nach Fischer. Die Irrtumswahrscheinlichkeit einer ungleichen Verteilung ist als P-Wert in der Tabelle angegeben. *spa*-Typen mit mehr als drei Isolaten werden einzeln angegeben. *spa*-Typen mit exakt drei und mit weniger als drei Isolaten wurden für die Analyse gruppiert. *agr*-Typ IV wurde unter den Studienisolaten nicht identifiziert und ist deshalb nicht berücksichtigt.

Weder der *spa*-Typ noch der *agr*-Typ können also zwischen kolonisierenden und Infektions-assoziierten Isolaten unterscheiden. Eine Risikoabschätzung durch *in vitro* Bestimmung molekularer Marker für das Potential eines MRSA-Stammes eine klinische Infektion *in vivo* zu verursachen scheint demnach auf diesem Wege nicht möglich.

5 Diskussion

In zunehmendem Maße wird der Eigenschaft von *Staphylococcus aureus* als fakultativ intrazellulärem Erreger Bedeutung zugemessen [74, 75]. Wurde *S. aureus* klassischerweise als extrazellulärer Krankheitserreger angesehen, so konnte mittlerweile in einer Vielzahl von *in vitro*-Studien die Aufnahme (und Persistenz) von *S. aureus* in unterschiedlichste(n) Zelltypen nachgewiesen werden [74]. Eine Vielzahl an Tiermodellen legt einen Zusammenhang des Potentials, Fibronektin zu binden (und damit zur zellulären Invasion) und der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Isolats mit einer invasiven Infektion assoziiert zu sein, nahe (siehe Kapitel 1.3). In Gewebeproben von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis und rezidivierender Tonsillitis wurde intrazellulärer *S. aureus* identifiziert [106-108]. Auch der klinische Verlauf invasiver *S. aureus*-Infektionen wie beispielsweise der Osteomyelitis mit häufig schlechtem Ansprechen auf eine antibiotische Therapie und Rezidiven nach initial erfolgreicher Therapie könnte zumindest teilweise durch das Potential von *S. aureus* erklärt werden, Zellen zu invadieren und dort zu überleben. Auch wenn das Potential von *S. aureus* zur zellulären Invasion für die Pathogenese von invasiven und chronischen Infektionen *in vivo* bedeutungsvoll zu sein scheint, fehlt bisher ein direkter Nachweis dieses Zusammenhangs. Die Bedeutung von fakultativ intrazellulärem *S. aureus* für die Klinik ist bisher nicht letztendlich geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, den angenommenen Zusammenhang von zellulärer Invasivität *in vitro* und klinischem Verhalten *in vivo* zu untersuchen. Hierzu wurden MRSA-Isolate aus einer parallel laufenden Prävalenz-Studie am Universitätsklinikum in Würzburg [125] gesammelt, molekular charakterisiert, das Potential zellulärer Invasivität *in vitro* ermittelt und die Assoziation mit einer Infektion *in vivo* nachverfolgt. Zusätzlich wurde eine Referenzgruppe von *S. aureus*-Isolaten etabliert, die formal nicht in den Bereich der Prävalenz-Studie fielen, aber klinisch mit vergleichsweise invasiven Infektionen (Osteomyelitis und infektiöse Endokarditis) assoziiert waren (siehe Abb. 6 und Tab. 4).

In dieser Studie wurde bewusst ein Kollektiv klinischer *S. aureus*-Isolate untersucht, um kliniknahe und auf die *in vivo*-Situation übertragbare Erkenntnisse über fakultativ intrazellulären *S. aureus* zu ermöglichen. In einem Kontrollzeitraum wurden zeitgleich Methicillin-sensible *S. aureus*-Isolate innerhalb der MRSA-Prävalenz-Studie gesammelt, um die komplette *S. aureus*-Population darstellen zu können und die Eigenschaft der gesammelten MRSA-Isolate als das natürliche Abbild einer klinischen MRSA-Population zu belegen. Zusätzlich konnten auf diese Weise auch epidemiologische Daten (wie die MRSA-Prävalenz etc.) gewonnen werden. Da innerhalb der MRSA-Prävalenz-Studie die Nachverfolgung der MRSA bezüglich ihres klinischen Verhaltens (Kolonisierer oder Infektions-assoziiert?) vorgesehen war, wurden diese zur weiteren Analyse ausgewählt. Der Mechanismus zellulärer Invasivität von *S. aureus* ist gut untersucht [113, 114] (siehe Kapitel 1.3). Eine Korrelation von zellulärer Invasivität und molekularen Markern wie dem *spa*-Typ, *SCCmec*-Typ und Expression von Pls konnte gezeigt werden [39-41]. In dieser Studie sollte die Reproduzierbarkeit dieser molekularen Marker anhand eines Kollektivs klinischer MRSA-Isolate überprüft und die Korrelation weiterer Marker mit der zellulären Invasivität getestet werden. Bei bekannter Korrelation von molekularen Markern und zellulärer Invasivität wurde unter der Annahme, dass sich kolonisierende und Infektions-assoziierte MRSA-Isolate in ihrem Potential zellulärer Invasivität unterscheiden, in dieser Arbeit außerdem untersucht, ob molekulare Marker allein die Virulenz eines Isolates vorherzusagen vermögen. Der Nachweis einer Methicillin-Resistenz innerhalb der MRSA-Prävalenz-Studie erfolgte primär über den GeneOhm™ MRSA-Schnelltest und Kultur. Zusätzlich wurden die Testergebnisse durch weitere Nachweisverfahren überprüft (siehe Kapitel 3.1). So konnten insgesamt 28 durch den MRSA-Schnelltest initial als Methicillin-resistente *S. aureus*-Isolate im weiteren Verlauf als Methicillin-sensibel identifiziert werden. Der Positiv Prädiktive Wert des Tests fiel folglich mit 0,636 moderat aus. Die SCC-positiven, *mecA*-negativen Isolate (siehe Kapitel 4.2) wurden im weiteren Verlauf als MSSA berücksichtigt.

Die Prävalenz von MRSA im Kontrollzeitraum (siehe Tab. 1) betrug 2,28%, die Prävalenz von *S. aureus* betrug 20,28% und die MRSA-Rate an *S. aureus* ergab 11,22%. Diese Zahlen, wenn auch vergleichsweise niedrig, sprechen für eine ausreichende Sensitivität und damit für die gute Abstrichqualität und Weiterverarbeitung der Proben im Labor innerhalb der Prävalenz-Studie. Auf Basis der *spa*-Typisierung und BURP-Analyse konnte die Struktur der gesamten *S. aureus*-Population, aus der die MRSA-Isolate der Studie stammen, dargestellt werden (Abb. 11). Wie erwartet [136] zeigten die MRSA-Isolate im Vergleich zu den MSSA-Isolaten der Studie eine geringere genetische Diversität. MRSA-Isolate zeigten ein gehäuftes Vorkommen in wenigen *spa*-Typen verglichen mit MSSA. Diese Daten unterstützen die MRSA dieser Studie als ein natürliches Abbild einer klinischen MRSA-Population. Durch Korrelation von zellulärer Invasivität mit molekularen Markern wurden *spa*-Typ t001, die SCC*mec*-Typen I und V und die Anwesenheit des *pIs*-Gens als Indikatoren verminderter Invasivität und die *spa*-Typen t008, t063 und SCC*mec*-Typ IV als Indikatoren erhöhter zellulärer Invasivität identifiziert (siehe Abb. 14). Diese Ergebnisse zeigen die Reproduzierbarkeit dieser Korrelation auch für eine Population klinischer MRSA-Isolate. Außerdem vermögen auch weitere (als die bisher publizierten [39] *spa*- und SCC*mec*-Typen) als molekulare Marker zellulärer Invasivität zu fungieren. Allerdings kann für die Isolate mit *spa*-Typ t001 und SCC*mec*-Typ I die geringe zelluläre Invasivität dadurch erklärt werden, dass alle Isolate *pIs*-positiv sind. Ein weiterer und bisher nicht beschriebener Marker zellulärer Invasivität scheint der *agr*-Typ zu sein. Durch *agr*-Typisierung der MRSA ließen sich die Isolate in Gruppen signifikant verschiedener Invasivität unterscheiden (Abb. 14). Auch das Hämolyseverhalten der MRSA-Isolate schien anfangs die zelluläre Invasivität vorhersagen zu können. Nicht-hämolysierende Isolate zeigten sich signifikant geringer invasiv als die hämolysierenden MRSA-Studienisolate. Dieses Ergebnis war nach dem verbreiteten Modell der *S. aureus*-Genregulation nicht zu erwarten, da die für die Invasivität maßgeblich verantwortlichen FnBPs nicht zeitgleich (sondern sequentiell) mit den Hämolsinen exprimiert werden (siehe Agr-Genregulator; Kapitel 1.2.4). Eine

Erklärung lieferte jedenfalls teilweise der anti-invasive Effekt des *pIs*-Produkts. Alle *pIs*-positiven MRSA fanden sich in der Gruppe der nicht-hämolyisierenden Isolate. Wurden die *pIs*-positiven Isolate von der Analyse ausgeschlossen, verlor sich der signifikante Unterschied beider Gruppen (siehe Abb. 13). Dennoch lag die Invasivität der nicht-hämolyisierenden MRSA-Isolate auch nach Ausschluss der *pIs*-positiven Isolate von der Analyse unter der durchschnittlichen Invasivität der hämolyisierenden Isolate. Dies stellt weiterhin einen (hier nicht aufklärbaren) Widerspruch zum geltenden Regulations-Modell der Virulenzfaktoren von *S. aureus* dar.

Der Vergleich der zellulären Invasivität von kolonisierenden und Infektions-assoziierten MRSA-Isolaten ergab zwar eine etwas höhere durchschnittliche mediane Invasivität der Infektions-assoziierten Isolate (Median 108% der Infektions-assoziierten versus 100% der kolonisierenden Isolate), allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Die durchschnittliche mediane Invasivität der Referenzisolate für vergleichsweise invasive Infektionen war mit 110% auf dem gleichen Niveau wie die Gruppe der Invasions-assoziierten MRSA-Studienisolate. Auch hier zeigte sich der Unterschied im Vergleich zu den kolonisierenden Studienisolaten als statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 15).

Nach diesen Ergebnissen vermag die *in vitro* gemessene zelluläre Invasivität nicht zwischen kolonisierenden und Infektions-assoziierten MRSA-Isolaten zu unterscheiden. Eine Abschätzung des klinischen Verhaltens auf Basis der Bestimmung der Invasivität *in vitro* ist demnach nicht möglich.

Abschließend wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die alleinige Bestimmung molekularer Marker zellulärer Invasivität eine Abschätzung der *in vivo* Virulenz eines Isolates ermöglichen könnte. Durch den exakten Test nach Fischer wurde auf eine überzufällig unterschiedliche Verteilung von *spa*- und *agr*-Typen unter den kolonisierenden und Infektions-assoziierten MRSA-Isolaten dieser Studie getestet (siehe Tab. 5). Doch analog der zellulären Invasivität konnten auch die zugehörigen Marker *spa*- und *agr*-Typ nicht zwischen kolonisierenden und Infektions-assoziierten Isolaten unterscheiden. Eine Risikoabschätzung für das

Potential eines Isolates, eine Infektion zu verursachen, scheint durch alleinige Bestimmung des *spa*- oder *agr*-Typs also ebenfalls nicht möglich.

Trotz knapp 4000 in die Prävalenz-Studie eingeschlossener Fälle und 109 MRSA-Isolate war die Anzahl der Infektions-assoziierten Isolate mit 16 relativ gering. Es könnte also sein, dass eine zu geringe Fallzahl das Erkennen eines statistischen Unterschieds der zellulären Invasivität zwischen kolonisierenden und Infektions-assoziierten MRSA-Isolaten verhindert hat. Dennoch ist diese Studie nach unserem Kenntnisstand die größte, die die Relevanz der zellulären Invasivität *in vitro* für die Etablierung einer Infektion *in vivo* untersucht hat. Zusätzlich wurden die Ergebnisse durch eine externe Kontrollgruppe von 13 Infektions-assoziierten Isolaten, die sich bezüglich der zellulären Invasivität wie die Infektions-assoziierten Isolate der Prävalenz-Studie verhielten, unterstützt. Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist, dass sich die Daten auf MRSA-Isolate beziehen. Eine Extrapolation der Ergebnisse auf MSSA-Isolate und damit *S. aureus*-Isolate insgesamt ist auf der Grundlage dieser Daten nicht automatisch zulässig.

Die Etablierung einer Infektion *in vivo* zu untersuchen ist komplex und jede Studie zur Untersuchung dieser Zusammenhänge (so auch die vorliegende) bringt es mit sich, dass dieses komplexe Modell stark vereinfacht wird. Durch die Vereinfachung bleiben Faktoren unberücksichtigt, die einen großen Einfluss auf die Etablierung einer Infektion haben. So konnten beispielsweise der Einfluss von Wirtsfaktoren wie Krankheit oder Immunsuppression nicht untersucht werden. Ein weiterer bedeutender Faktor ist die Genregulation von *S. aureus* im Verlauf der Etablierung einer Infektion *in vivo*. Es wäre interessant zu untersuchen, in welcher Phase einer Infektion welche Gene (z.B. Gene, die für *S. aureus*-Adhäsine kodieren) wie reguliert sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit denen zweier kürzlich veröffentlichter Studien. In einer Studie von Park et al. [97] konnte kein Unterschied bezüglich der zellulären Invasivität zwischen *S. aureus*-Isolaten von Patienten mit einfacher Bakteriämie und Isolaten von Patienten mit Bakteriämie plus Absiedelung der Bakterien in unterschiedliche Organe gefunden werden. Allerdings waren die Fallzahlen klein und die Isolate nicht

genetisch (sondern nur epidemiologisch) charakterisiert. Ein weiterer Vorteil dieser Studie gegenüber der Studie von Park et al. ist die geringe Anzahl an Katheter-assoziierten Infektionen innerhalb der Infektions-assoziierten Vergleichsgruppe. Bei Katheter-assoziierten Infektionen scheint die Fähigkeit eines Isolats zur Adhäsion an Fremdkörper entscheidender als das Potential zellulärer Invasivität.

In einer zweiten Studie von Ythier et al. [138] konnte das *in vitro* gemessene Potential eines *S. aureus*-Isolats, Fibronektin oder Fibrinogen zu binden, nicht zwischen kolonisierenden, Blutkultur-Isolaten und mit einer infektiösen Endokarditis-assoziierten (retrospektiv gesammelten) Isolaten unterscheiden. Im Vergleich zu dieser Studie wurde mit dem von uns verwendeten Invasions-Test die zelluläre Invasivität insgesamt und nicht nur die Adhärenz an Fibronektin/ Fibrinogen für eine Population von prospektiv gesammelten und molekular charakterisierten MRSA-Isolaten bestimmt.

Die molekulare Charakterisierung anhand verschiedener genetischer Marker ist wertvoll, da mit einem populationsbasierten Ansatz (wie in der vorliegenden Studie angewendet) das Risiko, verschiedene Klone desselben *S. aureus*-Stamms zu untersuchen, minimiert werden kann.

In einer zukünftigen Studie könnte in einem ähnlichen Versuchsaufbau auch die Bedeutung sogenannter *S. aureus*-small colony variants (SCVs) für den klinischen Verlauf von Infektionen untersucht werden. *S. aureus*-SCVs sind eine phänotypisch langsam wachsende Subpopulation mit veränderter Kulturmorphologie und besonderen biochemischen Charakteristika. Diesen Veränderungen liegen nach neueren Erkenntnissen Stoffwechseldefekte zu Grunde, die den Elektronen-Transport stören. Klinisch sind *S. aureus*-SCV-Infektionen mit persistierenden und rezidivierenden Infektionen assoziiert, die einer antibiotischen Therapie schwerer zugänglich sind [139].

Zusammenfassend festzustellen bleibt, dass die zelluläre Invasivität zuverlässig und umfassend mit molekularen Markern (bekannte und neu hinzugekommene) korreliert. Der genetische Hintergrund eines Isolates scheint also einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf das Potential der zellulären Invasivität zu haben.

Allerdings bleibt die Relevanz von *S. aureus* als fakultativ intrazellulärem Erreger für die Etablierung einer Infektion *in vivo* trotz vieler Indizien weiterhin offen. Auch eine Risikoabschätzung durch Charakterisierung eines Isolats *in vitro* für den klinischen Verlauf *in vivo* ist nach den vorliegenden Daten nicht möglich.

Für die Zukunft erscheint es lohnenswert zu untersuchen, ob die in dieser Studie untersuchten molekularen Marker zellulärer Invasivität in anderen Abschnitten der Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen, wie beispielsweise dem Verlauf einer Infektion, der Wahrscheinlichkeit, komplizierte oder rezidivierende Infektionen zu verursachen oder mit bestimmten Infektionen assoziiert zu sein, eine Rolle spielen könnten.

6 Zusammenfassung

Hintergrund

Zunehmend wird der Eigenschaft von *Staphylococcus aureus* als fakultativ intrazellulärem Erreger Bedeutung zugemessen. Ein direkter Nachweis der *in vivo* Relevanz von fakultativ intrazellulärem *S. aureus* bleibt allerdings bisher aus. Der Mechanismus zellulärer Invasivität ist bekannt und korreliert mit verschiedenen molekularen Markern (*spa*-Typ, *SCCmec*-Typ und *pls*/PIs). In dieser Studie wurde die Zuverlässigkeit und Ausweitbarkeit dieser Marker getestet. Des Weiteren wurde überprüft, ob sich die zelluläre Invasivität von kolonisierenden und Infektions-assoziierten MRSA-Isolaten unterscheidet und, ob die alleinige Bestimmung molekularer Marker *in vitro* die Virulenz eines Isolats *in vivo* abzuschätzen vermag.

Methoden

Insgesamt wurden 109 MRSA-Isolate gesammelt, molekular charakterisiert (*spa*-Typ, BURP-Analyse, *SCCmec*-Typ, *pls*, *agr*-Typ, Hämolyseverhalten) und das Potential zellulärer Invasivität *in vitro* ermittelt. Die Assoziation eines Isolates mit einer Infektion *in vivo* wurde nachverfolgt (93 Kolonisierer versus 16 Infektions-assoziierte-Isolate). Zusätzlich wurde eine Referenzgruppe aus 13 *S. aureus*-Isolaten etabliert, die klinisch mit vergleichsweise invasiven Infektionen assoziiert waren (12 Osteomyelitis-Isolate und 1 Endokarditis-Isolat).

Ergebnisse

Die bekannten molekularen Marker zellulärer Invasivität korrelieren zuverlässig in einer Population klinischer MRSA-Isolate und lassen sich auch auf bisher nicht bekannte (*spa*- und *SCCmec*-) Typen ausweiten. Das Hämolyseverhalten korrelierte nicht mit der zellulären Invasivität. Der *agr*-Typ wurde als weiterer molekularer Marker identifiziert. Die zelluläre Invasivität war unabhängig von der Etablierung einer Infektion *in vivo* (mediane Invasivität der Kolonisierer 100% versus 108% der Infektions-assoziierten Studienisolate und 110% der externen Referenzisolate). Des Weiteren waren die molekularen Marker *spa*- und *agr*-Typ nicht in der Lage, die Virulenz eines MRSA-Isolats *in vivo* abzuschätzen.

Diskussion

Die zelluläre Invasivität klinischer MRSA-Isolate korreliert zuverlässig mit molekularen Markern. Allerdings vermögen weder die zelluläre Invasivität, noch mit ihr assoziierte molekulare Marker die Etablierung einer Infektion *in vivo* vorherzusagen. Beide scheinen also als Surrogat-Parameter zur Abschätzung der klinischen Virulenz eines Isolats ungeeignet. Zur Klärung der Frage, ob molekulare Marker zellulärer Invasivität in anderen Abschnitten der Pathogenese von *S. aureus*- Infektionen eine Rolle spielen, bedarf es weiterer Studien.

7 Anhang

Tabelle 5. Zusammenstellung molekularer Charakteristika (SCC*mec*-Typ, Anwesenheit des *pls*-Gens, *spa*-Typ und *agr*-Typ) der 109 MRSA (A), der 28 SCC⁺/*mecA*⁻-Isolate (B) und der 13 Osteomyelitis bzw. Endokarditis assoziierten *S. aureus*-Isolate (C). Zusätzlich sind in der Tabelle das Hämolyseverhalten und die Assoziation des jeweiligen Isolates mit einer klinischen Infektion angegeben.

Isolat	SCC <i>mec</i>	<i>pls</i>	<i>spa</i>	<i>agr</i>	β-Hämolyse	Infektion
(A)						
BS500, BS501, BS503	I	+	t001	II		
BS604	I	+	t001	II		+
BS622, BS624	I	+	t023	II		
BS505, BS509	II		t002	II		
BS512, BS620, BS634	II		t002	II	+	
BS549, BS600, BS606	II		t002	II		+
BS508 ² , BS527 ² , BS643	II		t003	II		
BS504, BS506, BS522 ² , BS525 ² , BS526 ² , BS528, BS529 ² , BS530 ² , BS531 ² , BS536 ² , BS537, BS538 ² , BS540 ² , BS541 ² , BS544 ² , BS546 ² , BS547 ² , BS548 ² , BS552, BS555 ² , BS556 ² , BS557 ² , BS563 ² , BS564, BS567 ² , BS569 ² , BS570 ² , BS572 ² , BS575, BS579 ² , BS580 ² , BS582 ² , BS585, BS587 ² , BS592 ² , BS594 ² , BS595 ² , BS597, BS610 ² , BS614, BS615 ² , BS619 ² , BS621 ² , BS631, BS639 ² , BS640 ² , BS641 ² , BS645 ² , BS662 ²	II		t003	II	+	
BS647	II		t003	II		+
BS516, BS599, BS601, BS602, BS605, BS626	II		t003	II	+	+
BS644	II		t004	I	+	
BS502, BS566	II		t014	II	+	
BS627	II		t027	II	+	
BS607	II		t027	II	+	+
BS560, BS586	II		t045	II	+	
BS603	II		t045	II	+	+
BS628	II		t504	II	+	+
BS589	II		t508	II	+	
BS545	II		t1139	II	+	
BS562	II		t1227	II	+	
BS517	II		t2841	II	+	
BS637	II		t3441	I		
BS598	III		t002	III	+	+
BS524	IV		t002	II	+	
BS611, BS629	IV		t004	I	+	
BS609	IV		t005	I		

Isolat	SCCmec	<i>pls</i>	<i>spa</i>	<i>agr</i>	β-Hämolyse	Infektion
BS591	IV		t008	I		
BS581	IV		t008	I	+	
BS608	IV		t008	I	+	+
BS583	IV		t024	I	+	
BS616	IV		t063	I		
BS513, BS515, BS519, BS521, BS573, BS613	IV		t063	I	+	
BS576	IV		t247	I	+	
BS588, BS590	V		t011	I	+	
BS593	V		t1255	I	+	
BS623	V		t3423	I	+	
BS618	NT		t091	I	+	
(B)						
BS561 ¹	I	+	t008	ND	+	
BS596 ¹	I		t003	ND	+	
BS518 ¹	I		t127	ND		
BS533 ¹	I		t127	ND	+	
BS523 ¹	NT		t002	ND		
BS511 ¹	NT		t002	ND	+	
BS578 ¹ , BS636 ¹	NT		t003	ND	+	
BS625 ¹ , BS646 ¹	NT		t008	ND	+	
BS635 ¹	NT		t056	ND	+	
BS520 ¹ , BS550 ¹ , BS551 ¹ , BS553 ¹ , BS559 ¹ , BS565 ¹ , BS571 ¹ , BS630 ¹	NT		t127	ND	+	
BS632 ¹	NT		t362	ND	+	
BS633 ¹	NT		t559	ND	+	
BS535 ¹	NT		t589	ND	+	
BS510 ¹	NT		t888	ND	+	
BS568 ¹	NT		t1491	ND	+	
BS558 ¹	NT		t1931	ND	+	
BS507 ¹	NT		t2814	ND		
BS574 ¹	NT		t3174	ND	+	
BS577 ¹	NT		t3176	ND	+	
(C)						
BS651	I	+	t001	ND		OM
BS648	I	+	t001	ND	+	OM
BS649, BS653, BS654, BS655, BS656	II		t003	ND	+	OM
BS650	IV		t008	ND	+	OM
BS652 ¹	IV	+	t068	ND		OM
BS657 ¹	MSSA		t084	ND	+	OM
BS660 ¹	MSSA		t116	ND	+	IE
BS659 ¹	MSSA		t1710	ND	+	OM
BS658 ¹	MSSA		t355	ND	+	OM

OM, Osteomyelitis; IE, Infektiöse Endokarditis; ND, nicht durchgeführt;
 Infektion, siehe Tab. 3 für weitere Informationen; NT, nicht typisierbar;
 MSSA, Methicillin-sensibler *S. aureus*; Hämolyse, β-Hämolyse;
¹ *mecA*-negativ, ² Zelluläre Invasivität nicht getestet

8 Literaturverzeichnis

1. De la Fuente R, Suarez G, Schleifer KH. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep. Int J Syst Bacteriol **1985**; 35:99-102.
2. Dörries R, H. Hof. Medizinische Mikrobiologie. Duale Reihe **2004**; 3. komplett überarbeitete und erweiterte Auflage.
3. RKI. Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA. Robert Koch Institut - Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte **2009**; Aktualisierte Fassung vom September 2009; Erstveröffentlichung im Epidemiologischen Bulletin 08/2000.
4. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis **2005**; 5:751-62.
5. Williams RE. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. Bacteriol Rev **1963**; 27:56-71.
6. Armstrong-Esther CA. Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. Ann Hum Biol **1976**; 3:221-7.
7. Ridley M. Perineal carriage of *Staph. aureus*. Br Med J **1959**; 1:270-3.
8. Rimland D, Roberson B. Gastrointestinal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol **1986**; 24:137-8.
9. Guinan ME, Dan BB, Guidotti RJ, et al. Vaginal colonization with *Staphylococcus aureus* in healthy women: a review of four studies. Ann Intern Med **1982**; 96:944-7.
10. Dancer SJ, Noble WC. Nasal, axillary, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* among women: identification of strains producing epidermolytic toxin. J Clin Pathol **1991**; 44:681-4.

11. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev **1997**; 10:505-20.
12. Kirby WM. Extraction of a highly potent Penicillin inactivator from Penicillin resistant Staphylococci. Science **1944**; 99:452-3.
13. Jevons MP, Rolinson GN, Knox R. Celbenin-resistant Staphylococci. Brit Med J **1961**; 1:124-&.
14. Jevons MP, Coe AW, Parker MT. Methicillin resistance in staphylococci. Lancet **1963**; 1:904-7.
15. GERMAP. Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch, **2008**.
16. ECDC. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009 Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, **2010**.
17. RKI. Basisdaten der stationären Krankenhausversorgung in Deutschland – nosokomiale Infektionen. Epidemiologisches Bulletin 36 **2010**.
18. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect **2007**; 13:222-35.
19. CDC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States, 2002. JAMA **2002**; 288:824-5.
20. CDC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* - Pennsylvania, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep **2002**; 51:902.
21. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis **2008**; 46 Suppl 5:350-9.
22. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis **2008**; 46 Suppl 5:344-9.

23. Kluytmans J, Struelens M. Meticillin resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital. *BMJ* **2009**; 338:b364.
24. Clarke SR, Foster SJ. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol* **2006**; 51:187-224.
25. Patti JM, Hook M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol* **1994**; 6:752-8.
26. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* **2005**; 94:278-85.
27. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **1998**; 339:520-32.
28. Burnside K, Lembo A, de Los Reyes M, et al. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *PLoS One* **2010**; 5:e11071.
29. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* **2000**; 13:16-34, table of contents.
30. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* **2007**; 13:1510-4.
31. Janzon L, Lofdahl S, Arvidson S. Identification and nucleotide sequence of the δ -lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* **1989**; 219:480-5.
32. Janzon L, Arvidson S. The role of the δ -lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* **1990**; 9:1391-9.

33. Giese B, Glowinski F, Paprotka K, et al. Expression of δ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of β -toxin. *Cell Microbiol* **2011**; 13:316-29.
34. Hilden P, Savolainen K, Tynnela J, Vuento M, Kuusela P. Purification and characterisation of a plasmin-sensitive surface protein of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem* **1996**; 236:904-10.
35. Kuusela P, Hilden P, Savolainen K, Vuento M, Lyytikainen O, Vuopio-Varkila J. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains not identified by slide agglutination tests. *J Clin Microbiol* **1994**; 32:143-7.
36. Juuti K, Ibrahim S, Virolainen-Julkunen A, Vuopio-Varkila J, Kuusela P. The *pls* gene found in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains is common in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri*. *J Clin Microbiol* **2005**; 43:1415-9.
37. Ito T, Katayama Y, Asada K, 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**; 45:1323-36.
38. Savolainen K, Paulin L, Westerlund-Wikstrom B, Foster TJ, Korhonen TK, Kuusela P. Expression of *pls*, a gene closely associated with the *mecA* gene of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, prevents bacterial adhesion in vitro. *Infect Immun* **2001**; 69:3013-20.
39. Werbick C, Becker K, Mellmann A, et al. Staphylococcal chromosomal cassette *mec* type I, *spa* type, and expression of PIs are determinants of reduced cellular invasiveness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Infect Dis* **2007**; 195:1678-85.
40. Juuti KM, Sinha B, Werbick C, Peters G, Kuusela PI. Reduced adherence and host cell invasion by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing the surface protein PIs. *J Infect Dis* **2004**; 189:1574-84.

41. Hussain M, Schafer D, Juuti KM, et al. Expression of PIs (Plasmin Sensitive) in *Staphylococcus aureus* Negative for *pIs* Reduces Adherence and Cellular Invasion and Acts by Steric Hindrance. *J Infect Dis* **2009**; 200:107-117.
42. Deisenhofer J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* **1981**; 20:2361-70.
43. Hartleib J, Kohler N, Dickinson RB, et al. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* **2000**; 96:2149-56.
44. Hallin M, Friedrich AW, Struelens MJ. *spa* typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol* **2009**; 551:189-202.
45. Frenay HM, Theelen JP, Schouls LM, et al. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* **1994**; 32:846-7.
46. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Turnwald D, Vogel U. 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**; 41:5442-8.
47. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* **1999**; 37:3556-63.
48. Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, et al. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on *spa* polymorphisms. *BMC Microbiol* **2007**; 7:98.
49. Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, et al. Characterization of clonal relatedness among the natural population of *Staphylococcus aureus* strains by using *spa* sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm. *J Clin Microbiol* **2008**; 46:2805-8.

50. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **1994**; 176:269-75.
51. Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* **2008**; 42:541-64.
52. Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol Gen Genet* **1986**; 202:58-61.
53. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **1988**; 170:4365-72.
54. Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, et al. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* **1995**; 248:446-58.
55. Ji G, Beavis RC, Novick RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**; 92:12055-9.
56. Zhang L, Gray L, Novick RP, Ji G. Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **2002**; 277:34736-42.
57. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* **1993**; 12:3967-75.
58. Ji G, Beavis R, Novick RP. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **1997**; 276:2027-30.

59. Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AM, et al. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **2000**; 182:6517-22.
60. Goerke C, Kümmel M, Dietz K, Wolz C. Evaluation of intraspecies interference due to *agr* polymorphism in *Staphylococcus aureus* during infection and colonization. *J Infect Dis* **2003**; 188:250-6.
61. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, et al. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **2002**; 70:4987-96.
62. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:4352-9.
63. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **1984**; 158:513-6.
64. Ubukata K, Yamashita N, Konno M. Occurrence of a beta-lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **1985**; 27:851-7.
65. Matsushashi M, Song MD, Ishino F, et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **1986**; 167:975-80.
66. Chambers HF. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis* **1999**; 179 Suppl 2:S353-9.
67. Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2006**; 46:8-20.

68. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. 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**; 53:531-40.
69. Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50:3457-9.
70. Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Soderquist B, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52:3512-6.
71. Diep BA, Gill SR, Chang RF, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **2006**; 367:731-9.
72. Chen L, Mediavilla JR, Oliveira DC, Willey BM, de Lencastre H, Kreiswirth BN. Multiplex real-time PCR for rapid Staphylococcal cassette chromosome *mec* typing. *J Clin Microbiol* **2009**; 47:3692-706.
73. Alexander EH, Hudson MC. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl Microbiol Biotechnol* **2001**; 56:361-6.
74. Garzoni C, Kelley WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol* **2009**; 17:59-65.
75. Sinha B, Fraunholz M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol* **2010**; 300:170-5.
76. Lowy FD. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol* **2000**; 8:341-3.

77. Balwit JM, van Langevelde P, Vann JM, Proctor RA. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. J Infect Dis **1994**; 170:1033-7.
78. Proctor RA, Dalal SC, Kahl B, Brar D, Peters G, Nichols WW. Two diarylurea electron transport inhibitors reduce *Staphylococcus aureus* hemolytic activity and protect cultured endothelial cells from lysis. Antimicrob Agents Chemother **2002**; 46:2333-6.
79. Vann JM, Proctor RA. Cytotoxic effects of ingested *Staphylococcus aureus* on bovine endothelial cells: role of *S. aureus* α -hemolysin. Microb Pathog **1988**; 4:443-53.
80. von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA, Woltz C, Peters G, Gotz F. A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. J Bacteriol **1997**; 179:4706-12.
81. Krut O, Utermohlen O, Schlossherr X, Kronke M. Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Infect Immun **2003**; 71:2716-23.
82. Krut O, Sommer H, Kronke M. Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells. J Antimicrob Chemother **2004**; 53:167-73.
83. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. Microb Pathog **1999**; 26:317-23.
84. Tucker KA, Reilly SS, Leslie CS, Hudson MC. Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts. FEMS Microbiol Lett **2000**; 186:151-6.

85. Reott MA, Jr., Ritchie-Miller SL, Anguita J, Hudson MC. TRAIL expression is induced in both osteoblasts containing intracellular *Staphylococcus aureus* and uninfected osteoblasts in infected cultures. *FEMS Microbiol Lett* **2008**; 278:185-92.
86. Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **2004**; 304:1014-8.
87. Baughn R, Bonventre PF. Phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by normal mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* **1975**; 12:346-52.
88. Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC, Williams AS, Nousiainen MT. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog* **1995**; 19:409-19.
89. Reilly SS, Hudson MC, Kellam JF, Ramp WK. In vivo internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone* **2000**; 26:63-70.
90. Hussain M, Haggar A, Peters G, et al. More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect Immun* **2008**; 76:5615-23.
91. Esen M, Schreiner B, Jendrossek V, et al. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis* **2001**; 6:431-9.
92. Haslinger-Loffler B, Kahl BC, Grundmeier M, et al. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell Microbiol* **2005**; 7:1087-97.
93. Matussek A, Strindhall J, Stark L, et al. Infection of human endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces transcription of genes encoding an innate immunity response. *Scand J Immunol* **2005**; 61:536-44.

94. Park WB, Lee JH, Jeon JH, et al. Effect of tumor necrosis factor- α on intracellular *Staphylococcus aureus* in vascular endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2008**; 52:247-52.
95. Que YA, Haefliger JA, Piroth L, et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med* **2005**; 201:1627-35.
96. Schröder A, Schröder B, Roppenser B, et al. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells. *Mol Biol Cell* **2006**; 17:5198-210.
97. Park WB, Kim SH, Kang CI, et al. In vitro ability of *Staphylococcus aureus* isolates from bacteraemic patients with and without metastatic complications to invade vascular endothelial cells. *J Med Microbiol* **2007**; 56:1290-5.
98. Kintarak S, Whawell SA, Speight PM, Packer S, Nair SP. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect Immun* **2004**; 72:5668-75.
99. Mempel M, Schnopp C, Hojka M, et al. Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death. *Br J Dermatol* **2002**; 146:943-51.
100. Hagggar A, Hussain M, Lonnie H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* **2003**; 71:2310-7.
101. Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, Sherertz R. Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res* **2006**; 24:87-93.
102. Jevon M, Guo C, Ma B, et al. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* **1999**; 67:2677-81.

103. Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* **2000**; 164:3713-22.
104. Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, et al. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol* **2005**; 175:3907-19.
105. Kubica M, Guzik K, Koziel J, et al. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **2008**; 3:e1409.
106. Clement S, Vaudaux P, Francois P, et al. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* **2005**; 192:1023-8.
107. Plouin-Gaudon I, Clement S, Huggler E, et al. Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology* **2006**; 44:249-54.
108. Zautner AE, Krause M, Stropahl G, et al. Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. *PLoS One* **2010**; 5:e9452.
109. Sinha B, Herrmann M. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb Haemost* **2005**; 94:266-77.
110. Fowler VG, Jr., Nelson CL, McIntyre LM, et al. Potential associations between hematogenous complications and bacterial genotype in *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* **2007**; 196:738-47.
111. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, et al. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* **2003**; 185:3307-16.

112. Lindsay JA, Moore CE, Day NP, et al. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *J Bacteriol* **2006**; 188:669-76.
113. Sinha B, Francois PP, Nusse O, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cell Microbiol* **1999**; 1:101-17.
114. Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Hook M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell $\beta 1$ integrins. *Eur J Cell Biol* **2000**; 79:672-9.
115. Kuhn G, Francioli P, Blanc DS. Evidence for clonal evolution among highly polymorphic genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **2006**; 188:169-78.
116. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, et al. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med* **2004**; 10:243-5.
117. Weidenmaier C, Peschel A, Xiong YQ, et al. Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J Infect Dis* **2005**; 191:1771-7.
118. Brouillette E, Grondin G, Shkreta L, Lacasse P, Talbot BG. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog* **2003**; 35:159-68.
119. Proctor RA, Christman G, Mosher DF. Fibronectin-induced agglutination of *Staphylococcus aureus* correlates with invasiveness. *J Lab Clin Med* **1984**; 104:455-69.

120. Proctor RA. The staphylococcal fibronectin receptor: evidence for its importance in invasive infections. *Rev Infect Dis* **1987**; 9 Suppl 4:S335-40.
121. Kuypers JM, Proctor RA. Reduced adherence to traumatized rat heart valves by a low-fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **1989**; 57:2306-12.
122. Johansson A, Flock JI, Svensson O. Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* **2001**; 382:241-6.
123. Xiong YQ, Fowler VG, Yeaman MR, Perdreau-Remington F, Kreiswirth BN, Bayer AS. Phenotypic and genotypic characteristics of persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in vitro and in an experimental endocarditis model. *J Infect Dis* **2009**; 199:201-8.
124. Flock JI, Hienz SA, Heimdahl A, Schennings T. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **1996**; 64:1876-8.
125. Elias J, Schmitt C, Valenza G, et al. Readily available predictors may inform selection of screening method for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital admissions. Manuskript eingereicht **2011**.
126. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, 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**; 42:1875-84.
127. Schleifer KH, Fischer U. Description of a New Species of the Genus *Staphylococcus* - *Staphylococcus carnosus*. *Int J Syst Bacteriol* **1982**; 32:153-156.

128. Werbick C. Modulation der zellulären Invasivität von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) durch Pls (Plasmin-sensitives Protein). Institut für Medizinische Mikrobiologie. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des doctor medicinae: Medizinische Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, **2007**.
129. Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Moller JA, Westh H. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V. Clin Microbiol Infect **2007**; 13:725-7.
130. Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal *agr* alleles. Appl Environ Microbiol **2003**; 69:18-23.
131. Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **1996**; 15:60-4.
132. Mellmann A, Friedrich AW, Rosenkötter N, et al. Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks. PLoS Med **2006**; 3:e33.
133. Corkill JE, Anson JJ, Griffiths P, Hart CA. Detection of elements of the staphylococcal cassette chromosome (SCC) in a methicillin-susceptible (*mecA* gene negative) homologue of a fucidin-resistant MRSA. J Antimicrob Chemother **2004**; 54:229-31.
134. Mongkolrattanothai K, Boyle S, Murphy TV, Daum RS. Novel non-*mecA*-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother **2004**; 48:1823-36.

135. Stamper PD, Louie L, Wong H, Simor AE, Farley JE, Carroll KC. Genotypic and Phenotypic Characterization of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates misidentified as Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by the BD GeneOhm™ MRSA Assay. J Clin Microbiol **2011**.
136. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. PLoS Med **2010**; 7:e1000215.
137. Raspe M, Makgotlho E, Priller J, et al. Establishment of infection is independent of molecular markers (*spa*, *agr*) and cellular invasiveness of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Zur Publikation vorgesehen beim Journal of Infectious Diseases (Oxford University Press) **2011**.
138. Ythier M, Entenza JM, Bille J, et al. Natural variability of in vitro adherence to fibrinogen and fibronectin does not correlate with in vivo infectivity of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun **2010**.
139. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol **2006**; 4:295-305.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. M. Frosch für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Hygiene und Mikrobiologie durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bhanu Sinha für die äußerst konstruktive, intensive und kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. U. Vogel und Herrn Dr. J. Elias für die Möglichkeit MRSA-Isolate und weitere Daten aus der MRSA-Prävalenz-Studie zu beziehen und für die Hilfe und Beantwortung aller damit verbundenen Probleme und Fragen.

Herrn PD Dr. Alexander Mellmann für die BURP-Analyse der Studienisolate.

Als weiteren Mitarbeiter bzw. ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie danke ich Herrn Dr. Thiên-Trí Lâm für die aufwändige Einarbeitung in die Zellkultur und den Invasions-Test. Edward Makgotlho für die *agr*-Typisierung der MRSA-Studienisolate und die Kontrolle einiger experimenteller Ergebnisse. Johanna Priller für die Sammlung und *spa*-Typisierung der MSSA-Isolate des dreimonatigen Kontrollzeitraums. Dr. Deepak Chikkaballi für die Etablierung der *SCCmec*- und *pls*-PCR. Dr. Daniel Schäfer, Anna-Karina Lamprecht, Nadine Leitschuh für vielseitige Hilfe im Labor. Frau Dr. Doris Turnwald für die Recherche der Osteomyelitis- und Endokarditis-assoziierten *S. aureus*-Isolate. Simone Pusch für die Bereitstellung aller Studienisolate. Annett Oesterlein für die *spa*-Typisierung der MRSA-Isolate innerhalb der MRSA-Prävalenz-Studie.

Sowie meinen Eltern, Rainer Müller und Tamiko Dahlem für ihre inhaltliche und moralische Unterstützung.