

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,  
Medizinische Fakultät Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**MRSA-Prävalenz, Risikofaktoren einer Besiedelung  
und potenzielle Übertragungswege in Alten- und Pflegeeinrichtungen  
im Stadtgebiet Saarbrücken**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von Malte Brüggemann,  
geb. am 06.12.1973 in Neustadt in Holstein



# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	6
2.1	Staphylokokken.....	6
2.1.1	Virulenzfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
2.1.1.1	Adhäsine (MSCRAMMs).....	9
2.1.1.2	Invasine.....	9
2.1.1.3	Virulenzfaktoren, die eine Persistenz der Erreger ermöglichen (Immunschutz und -modulation).....	10
2.1.1.4	Expressionsregulation der Virulenzfaktoren.....	11
2.1.2	Erkrankungen durch <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
2.1.2.1	Invasive <i>S. aureus</i> Erkrankungen.....	12
2.1.2.2	Toxin-vermittelte <i>S. aureus</i> -Erkrankungen.....	13
2.1.3	Entwicklung der Antibiotikaresistenzen bei <i>S. aureus</i> .....	13
2.2	MRSA.....	14
2.2.1	Mechanismen der Methicillin-Resistenz.....	15
2.2.2	Level der Methicillin-Resistenz und beeinflussende Faktoren.....	17
2.2.2.1	Heterogene vs Homogene Resistenz.....	17
2.2.2.2	Resistenzlevel und Borderline-Resistenz.....	19
2.2.3	Multiresistenz bei MRSA.....	19
2.2.4	Community associated MRSA (caMRSA).....	22
2.2.5	Livestock-associated MRSA (laMRSA).....	24
2.2.6	MRSA-Typisierungsmethoden, epidemische MRSA-Klone.....	24
2.2.6.1	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	25
2.2.6.2	Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST).....	26
2.2.6.3	Single-Locus-Sequenz-Typisierung (spa-Typisierung).....	26
2.2.7	Prävalenz von MRSA in Krankenhäusern in Europa.....	30
2.2.8	Prävalenz von MRSA in Heim- und Pflegeeinrichtungen.....	32
2.2.9	Prävalenzraten bei Pflegekräften in Heim- und Pflegeeinrichtungen.....	34
2.2.10	Folgen der MSSA- und MRSA- Besiedelung und -Infektion.....	35
2.2.10.1	Medizinische Folgen.....	35
2.2.10.2	Ökonomische Folgen.....	36

2.3	Fragestellung .....	37
3	Material und Methoden .....	38
3.1	Studiendesign.....	38
3.2	Probenentnahme und Transport.....	38
3.3	Bakteriologische Untersuchungen.....	38
3.4	Empfindlichkeitsprüfung gegenüber relevanten Antibiotika .....	39
3.5	Stammasservierung.....	40
3.6	Molekularbiologische Untersuchungen (Pulsfeldgelelektrophorese und <i>spa</i> - Typisierung).....	40
4	Ergebnisse .....	41
4.1	Teilnehmer.....	41
4.2	Prävalenz .....	41
4.3	Besiedlungsort und Sensitivität der Untersuchungsmethode .....	44
4.4	Potenzielle Risikofaktoren und deren statistische Auswertung.....	45
4.4.1	Gruppierung der MRSA-Prävalenzen nach Heimen.....	46
4.4.2	Altersstruktur der Probanden .....	47
4.4.3	Dauer des Status als Heimbewohner.....	48
4.4.4	Krankenhausaufenthalte.....	49
4.4.4.1	Häufigkeit eines Krankenhausaufenthaltes .....	51
4.4.4.2	Gesamte Aufenthaltsdauer im Krankenhaus.....	51
4.4.4.3	Aufenthalt in einzelnen Krankenhäusern .....	52
4.4.5	Pflegestufe.....	53
4.4.6	Weitere Risikofaktoren .....	54
4.4.6.1	Diabetes mellitus .....	55
4.4.6.2	Sonden und Katheter .....	55
4.4.6.3	Offene Wunden und Geschwüre .....	56
4.4.7	Größe der Heimeinrichtung .....	56
4.4.8	Fälle bekannter MRSA-Besiedelung .....	57
4.5	Phänotypisierung mittels Agardiffusionstest und Antibiogramm .....	58
4.6	Molekularbiologische Typisierung.....	60
4.6.1	<i>spa</i> -Typisierung .....	60
4.6.2	Pulsfeldgelelektrophorese.....	62

4.6.2.1	Dem Rhein-Hessen-Epidemiestamm zugeordnete Bandenmuster und die entsprechenden <i>spa</i> -Typen .....	63
4.6.2.2	Dem Barnimer Epidemiestamm zugeordnete Bandenmuster und die entsprechenden <i>spa</i> -Typen .....	67
4.6.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse von Pulsfeldgelelektrophorese, <i>spa</i> -Typisierung und Phänotypisierung nach Antibiogramm .....	68
4.6.4	Typisierungsergebnisse, den einzelnen Heimen zugeordnet .....	71
4.7	MRSA Besiedelung der Mitarbeiter teilnehmender Alten- und Pflegeeinrichtungen	71
5	Diskussion .....	74
5.1	Gesamtprävalenz .....	74
5.1.1	Prävalenzvergleich mit Prävalenzraten aus Krankenhäusern .....	75
5.1.2	Prävalenzvergleich MSSA/MRSA-Raten .....	76
5.2	Risikofaktoren .....	77
5.2.1	Alter .....	77
5.2.2	Dauer des Heimaufenthalts .....	78
5.2.3	Krankenhausaufenthalte .....	78
5.2.4	Pflegestufe .....	79
5.2.5	Sonden und Katheter .....	79
5.2.6	Diabetes mellitus .....	79
5.2.7	Offene Wunden und Geschwüre .....	80
5.2.8	Größe des Heimes .....	80
5.3	Sensitivität bestimmter Abstrichlokalisationen .....	80
5.4	Typisierungsergebnisse .....	82
5.4.1	Antibiogramme .....	82
5.4.2	<i>spa</i> -Typisierung .....	82
5.4.3	PFGE .....	85
5.4.4	Vergleich der Typisierungsergebnisse .....	85
5.5	Ausbreitungswege .....	86
5.5.1	Lokale Ausbrüche oder Häufung von MRSA in einzelnen Einrichtungen .....	88
5.5.1.1	Einrichtung 3 .....	88
5.5.1.2	Einrichtung 10 .....	88
5.5.1.3	Einrichtung 12 .....	89
5.6	MRSA-Prävalenz beim Pflegepersonal .....	89

5.7	Schlussfolgerung .....	91
6	Literaturverzeichnis.....	93
7	Anhang .....	113
8	Danksagung.....	137

# 1 Zusammenfassung

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) sind unter den multiresistenten Erregern (MRE) die häufigste Ursache nosokomialer Infektionen. Im Vergleich mit Infektionen mit Methicillin-sensiblen Stämmen (MSSA) sind MRSA-Infektionen mit erhöhter Mortalität und höheren Kosten für das Gesundheitssystem assoziiert. Besiedlungen mit MRSA sind in den meisten Fällen asymptomatisch, bergen aber ein vierfach höheres Risiko einer MRSA-Infektion. Besiedelte können zudem als Vektoren fungieren.

Der großen infektionsepidemiologischen Bedeutung entsprechend, sind im klinischen Bereich in den allermeisten Fällen MRSA-Surveillancestrategien implementiert, Prävalenzen werden oftmals überregional erfasst. Im Bereich der Heimeinrichtungen mangelt es meist an analogen Strategien, entsprechend dünn ist die Datenlage hinsichtlich der MRSA-Prävalenz in Alten- und Pflegeeinrichtungen. Diese Arbeit liefert einen Beitrag zur Prävalenzerfassung in diesen Einrichtungen. Die Untersuchung erfolgte im Stadtgebiet von Saarbrücken. Die Erfassung innerhalb eines geschlossenen Stadtgebietes ist besonders geeignet, potentielle MRSA-Übertragungswege aufzudecken.

Zur Teilnahme bereiten Bewohnern wurden Abstriche aus beiden Nasenvorhöfen und, sofern vorhanden, weiteren Risikolokalisationen entnommen. Die Abstriche wurden bakteriologisch und mittels Antibiotika-Empfindlichkeitstestung auf das Vorliegen eines MRSA untersucht, ausgewählte Isolate sodann von Mitarbeitern des Mikrobiologischen Instituts der Universität Homburg molekularbiologisch mittels *spa*-Typisierung und / oder PFGE weiter differenziert.

In der vorliegenden Untersuchung wurde mit einer Gesamtprävalenz von 8,4% eine der bislang höchsten Prävalenzen in Alten- und Pflegeeinrichtungen in Deutschland nachgewiesen, das Ergebnis unterstreicht die im Vergleich zum klinischen Pool zunehmende Bedeutung der Heimeinrichtungen am MRSA-Gesamtpool. Die Prävalenz in den einzelnen Einrichtungen schwankte, lediglich in einer Einrichtung wurde kein MRSA nachgewiesen. In fünf Einrichtungen lag die Prävalenz über 10% und damit deutlich über dem nach Studienlage zu Erwartendem.

Um die lokale epidemiologische Situation in den einzelnen Einrichtungen beurteilen zu können, wurde auf Grundlage der sich im Agardiffusionstest zeigenden Resistenzprofile, für jede Heimeinrichtung gesondert, zwischen einem vorherrschenden Resistenzmuster und davon abweichenden Mustern differenziert, und anhand dieser Einordnung eine *spa*-Typisierung bei ein bis vier Isolaten mit vorherrschenden und allen Isolaten mit abweichenden Mustern durchgeführt. Insgesamt wurden bei einer Gesamtzahl von 114 MRSA-positiven Isolaten 46 Isolate *spa*-typisiert. Es wurden 14 unterschiedliche *spa*-Typen nachgewiesen. Die beiden am häufigsten nachgewiesenen *spa*-13 *spa*-Typen t003 und t504 zählen zu den endemischen Klonen des Saarlandes.

Von jedem Typ wurde mindestens ein Isolat mittels Elektrophorese untersucht, insgesamt wurden 33 Isolate einer PFGE unterzogen. 31 Isolate ließen sich anhand ihres Laufmusters dem Rhein-Hessen-Typ, zwei dem Barnimer Typ zuordnen.

Im Vergleich der Typisierungsergebnisse zeigte sich ein höherer Diskriminationsgrad der PFGE im Vergleich zur *spa*-Typisierung. Zur Beurteilung einer lokalen Ausbruchssituation ist die PFGE gegenüber der *spa*-Typisierung ein überlegenes Instrument. Die Ganzgenomsequenzierung bietet den derzeit höchsten Diskriminationsgrad epidemiologischer Methoden, die methodischen Fortschritte der vergangenen Jahre führen zu sinkenden Anwendungskosten, so dass die Ganzgenomsequenzierung verspricht, sich als neuer epidemiologischer Goldstandard durchzusetzen.

In zwei der Einrichtungen mit der höchsten MRSA-Prävalenz unter Bewohnern lag die MRSA-Prävalenz der Mitarbeiter noch über der der Bewohner. Unter Hinzuziehung der Typisierungsergebnisse kann in beiden Fällen von einem lokalen Ausbruch ausgegangen werden.

Die statistische Auswertung potenzieller Risikofaktoren erfolgte mittels SPSS. Für den Risikofaktor „Alter“ zeigte sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse ein positiver Zusammenhang zwischen einer hohen Prävalenz und einem niedrigen Alter ( $p= 0,007$ ).

Neben dem Alter der Bewohner erwies sich auch der Risikofaktor „Heimgröße“ als signifikant. In der Auswertung mittels Kontingenztafeln und Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstests konnte ein Zusammenhang zwischen einer Heimgröße  $\leq 120$  Bewohner und einer erhöhten MRSA-Prävalenz ( $p= 0,000$ ) festgestellt werden. Alle weiteren untersuchten Risikofaktoren zeigten keine statistische Signifikanz.

Die vorliegende Untersuchung unterstreicht die Bedeutung von Heimeinrichtungen als eigenständiges MRSA-Reservoir sowie die Notwendigkeit klarer Surveillancestrategien in Alten- und Pflegeheimen. Die in einzelnen Heimen dieser Studie sehr hohen MRSA-Besiedelungsraten des Pflegepersonals und die für zwei Einrichtungen nachgewiesenen lokalen MRSA-Ausbrüche lassen dabei ein Routinescreening von Pflegekräften sinnvoll erscheinen.

## **Summary**

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are the most common cause of nosocomial infections amongst multiresistant pathogens (MRE). Compared to infections with methicillin-sensitive strains (MSSA), MRSA infections are associated with increased mortality and higher costs for the health system. Although colonizations with MRSA are asymptomatic in most cases, the risk of MRSA infections is four times higher. Furthermore patients colonized with MRSA can act as vectors.

According to their high epidemiological significance, MRSA surveillance strategies are implemented in most clinics. Prevalence rates are often registered on a national level. A lack of analogue strategies exists in the field of nursing homes and long-term-care facilities, resulting in poor evidence regarding the prevalence of MRSA. This study contributes to the prevalence survey in nursing facilities. It was carried out in the city of Saarbrücken. The detection within a closed urban area is particularly suited to detect potential MRSA transmission paths.

Swab samples from both nasal vestibules and, if existing, from further risk localisations were taken from participating residents. The swabs were tested for MRSA via bacteriological examinations and antibiotic susceptibility testing. Selected isolates were then differentiated by means of *spa*-typing and / or PFGE by members of the Microbiological Institute of Homburg University.

With an overall prevalence of 8.4% this study demonstrates one of the highest prevalence rates ever measured in nursing and care facilities in Germany. The results underline the increasing importance of care facilities compared to the clinic pool within the total MRSA pool. The prevalence in the individual institutions varied, only one facility showed no existence of MRSA at all. In five facilities the prevalence was above 10%, which is significantly higher than expected according to current studies of relevance.

In order to evaluate the local epidemiological situation in each facility, it was differentiated between a prevailing resistance pattern and differing patterns. This was done individually for each care facility according to the results of the agar diffusion test. Based on this classification, a *spa* typing of one to four isolates with prevailing patterns and all isolates with different patterns was performed. Looking at a total number of 114 MRSA-positive isolates, 46 isolates were *spa* typed. Fourteen different *spa* types were detected. The two most commonly detected *spa* 13 *spa* types t003 and t504 are among the endemic clones in the federal state of Saarland.

At least one isolate of each type was examined by electrophoresis. In total, 33 isolates were subjected to PFGE. Based on the running patterns, 31 isolates could be assigned to the Rhine-Hessen and two to the Barnim type.

Comparing the typing results, PFGE typing showed a higher grade of discrimination in comparison to the *spa* typing. For the evaluation of a local outbreak situation PFGE typing is superior to the *spa* typing.

In two of the institutions with the highest prevalence of MRSA among residents, the MRSA prevalence of employees even exceeded that of the residents. With the assistance of the typing results, a local outbreak can be presumed in both facilities.

Potential risk factors were evaluated statistically by means of SPSS. For the risk factor "age" the one-factor analysis of variance showed a positive correlation between a high prevalence and a low age ( $p= 0,007$ ). In addition to the age of residents the risk factor "home size" was identified as significant. The analysis using contingency tables and chi-square tests of independence revealed a connection between a home size  $\leq 120$  inhabitants and an increased prevalence of MRSA ( $p= 0,000$ ). All other examined risk factors showed no statistical significance.

This study highlights the importance of residential care as an independent MRSA reservoir and the need for clear surveillance strategies in nursing homes. Due to very high MRSA colonization rates of staff members in individual nursing homes, as well as proven detected local MRSA outbreaks in two facilities, it appears sensible to perform a routine screening of nursing staff.

## 2 Einleitung

### 2.1 Staphylokokken

Staphylokokken sind Gram-positive, nichtsporenbildende Kugelbakterien von circa 1 µm Durchmesser. Sie sind unbeweglich und teilen sich in allen Ebenen des Raumes, weswegen sie sich in dichten Haufen oder Trauben anordnen. Der schottische Chirurg Alexander Ogston (1844-1929) fand 1881 in humanem Abszesseiter traubenähnliche Bakterienkluster und benannte sie aufgrund dieser Form „Staphylokokken“ (griech. *staphyle* = Traube). Der Göttinger Chirurg Friedrich Julius Rosenbach (1842-1923) konnte diese Bakterien 3 Jahre später kultivieren und klassifizierte die Staphylokokken, aufgrund der Pigmentierung ihrer Kolonien auf Agarmedien, in eine gelbpigmentierte, pathogene Art „*Staphylococcus pyogenes aureus*“ und in eine apathogene, weißpigmentierte Art „*Staphylococcus pyogenes albus*“. Die Differenzierung zwischen pathogenen und apathogenen anhand der Pigmentierung erwies sich in den folgenden Jahrzehnten als unzuverlässig. Einen neuen Ansatz zur Differenzierung wählte 1926 der Mikrobiologe Julius von Daranyi (1888-1958), als er den Zusammenhang zwischen der Plasmakoagulaseaktivität von Staphylokokken und ihrer pathogenen Bedeutung erkannte. Er schlug eine darauf basierende Differenzierung vor. Wenngleich aus heutiger Sicht die Einteilung der Staphylokokken in Koagulase-negative und -positive Arten keinen Rückschluss auf die Pathogenität und Virulenz dieser Mikroorganismen zulässt und auch keinen molekulargenetischen Hintergrund aufweist, wurde sie aus Gründen der Praktikabilität beibehalten. Man unterscheidet derzeit die Koagulase-positive Spezies *Staphylococcus aureus* und circa 40 weitere Staphylokokkenspezies und -subspezies, die dieses Enzym nicht produzieren. Taxonomisch wurden die Staphylokokken zusammen mit anderen Gram-positiven Kokken lange Zeit der Familie Micrococcaceae zugerechnet, molekularphylogenetische und chemotaxonomische Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Familie keine einheitliche Gruppe bildet und insbesondere die Gattungen *Staphylococcus* und *Micrococcus* nicht eng miteinander verwandt sind.<sup>1</sup> Daher werden die Staphylokokken heute meist dem großen *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*-Kluster zugerechnet<sup>2</sup>, teilweise wird auch vorgeschlagen, sie mit den Gattungen *Jeotgalicoccus*, *Gemella*, *Macrococcus* und *Salinococcus* einer eigenen Familie, der Staphylococcaceae zuzuordnen<sup>3</sup>.

Über die früher als apathogen eingestuften, Koagulase-negativen Staphylokokken ist seit längerem bekannt, dass sie zu den im Krankenhausmilieu am häufigsten isolierten Erregern gehören und an erster Stelle der Erreger von Infektionen intravasaler Katheter und Kunststoffimplantate („Plastikinfektionen“) stehen.<sup>4</sup> Auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken kommt es zum Erwerb von Resistenzeigenschaften; der Anteil *Methicillin-resistenter* Stämme ist bei den Koagulase-negativen Staphylokokken sogar deutlich höher als bei *S. aureus*.<sup>5</sup> Die größte pathogene und damit auch klinische Bedeutung aus der Gattung der Staphylokokken hat dennoch die Spezies *Staphylococcus aureus*. Der mit einem Arsenal an Virulenzfaktoren ausgestattete *S. aureus* ist Verursacher einer Reihe klassischer Infektionskrankheiten, problematisch ist insbesondere seine Rolle als nosokomialer Erreger. *S. aureus* ist dritthäufigster Erreger nosokomialer, d.h. im Krankenhaus erworbener Infektionen in Deutschland, bei den nosokomialen Septikämien sogar häufigster Erreger.<sup>6</sup> Dabei ist *S. aureus* sowohl normaler Kommensale des Menschen als auch pathogener Keim. Hauptstandort für eine *Staphylococcus aureus*-Besiedelung sind die Nasenvorhöfe. Andere häufig besiedelte Regionen sind die Axillae, Inguinalfalten und der Gastrointestinaltrakt. In den Nasenvorhöfen sind ungefähr 20% der erwachsenen Individuen dauerhaft, zwischen 30 und 60% intermittierend mit *Staphylococcus aureus* besiedelt<sup>7</sup>.

### 2.1.1 Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*

Der Bedeutung als nosokomialer Erreger entsprechend, besitzt *S. aureus* eine große Anzahl sehr verschiedener Virulenzfaktoren. Nach ihrer Lokalisation beziehungsweise ihrem Wirkungsort lassen sich strukturelle oder intrazelluläre (Polysaccharidkapsel, Oberflächenproteine) sowie sezernierbare oder extrazelluläre (Enzyme und Toxine) Virulenzfaktoren unterscheiden. Die Virulenzfaktoren lassen sich auch nach ihrer Funktion bei der Pathogenese von Infektionen einteilen (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus* nach pathogenetischer Funktion**

Virulenzfaktor/Funktion	Einzelne Faktoren	Wirkungsweise
Virulenzfaktoren, die eine Adhäsion der Erreger an das Wirtsgewebe ermöglichen (MSCRAMMs)	Kollagen-Bindungsprotein	Kollagene, Laminine und Fibronectine sind wichtige Bestandteile von Zelloberflächen, Bindegewebe und Basalmembranen
	Laminin-Bindungsprotein	
	Fibronectin-Bindungsprotein	

Virulenzfaktoren, die eine Invasion der Erreger ermöglichen	Hyaluronidase	Zerstörung von Wirtsgewebe
	Elastase	
	Lipase	
	Nuklease	
	Protease	
	Staphylokinase	Fibrinolyse
	Panton–Valentine-Leukozidin (PVL)	Gewebsnekrosen
Virulenzfaktoren, die eine Persistenz der Erreger ermöglichen (Immunschutz und -modulation)	Fibronectin-Bindungsprotein	Vermitteln Internalisierung
	Protein A	Verhindert Opsonierung, Phagozytoseschutz
	Polysaccharidkapsel	Verhindert Opsonierung,
	Biofilmproduktion	Biofilme erhöhen Antibiotikaresistenz
	Small-colony-variants (SCV)	Subpopulationen, entziehen sich intrazellulär dem Zugriff durch das Immunsystem
	Hämolyse ( $\alpha$ - $\gamma$ )	Zytotoxine, Porenbildung bei Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen
	Superantigene (Enterotoxine A-H und Toxic shock syndrome toxin)	Dysregulation des Immunsystems
	Panton–Valentine Leukozidin (PVL)	Lysiert Leukozyten durch Porenbildung
	Carotinpigmente	Antioxidanzien
	Staphylokinase	Inhibierung von $\alpha$ -Defensinen
	Plasmakoagulase	Fibrinbildung
Fibrinogen-Bindungsprotein (Clumpingfaktor)		

### 2.1.1.1 Adhäsine (MSCRAMMs)

Wichtige Oberflächenproteine von *Staphylococcus aureus* sind die sogenannten MSCRAMMs („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“), die die Fähigkeit zur Bindung an die extrazelluläre Matrix des Wirtsorganismus besitzen und damit entscheidend für die Initiierung von Infektionen sind<sup>8</sup>. *S. aureus* hat eine ganze Reihe dieser Oberflächenproteine, die unter anderem in der Lage sind, Fibronectin, Kollagen, Laminin, Elastin und Fibrinogen zu binden<sup>9</sup>. Virulenzfaktoren aus dieser Gruppe werden auch Adhäsine genannt und haben eine entscheidende Rolle bei der Initialisierung der Infektion. Neben der Aufgabe als Adhäsine können einige MSCRAMMs weitere wichtige pathogenetische Funktionen übernehmen. So sind Fibronectin-Bindungsproteine (FnBPs) entscheidende Faktoren bei der Internalisierung von *S. aureus* in Wirtszellen und wirken demnach auch als Invasine<sup>10</sup>. Ebenfalls zu den MSCRAMMs gezählt wird das von fast allen *S. aureus*-Stämmen exprimierte Protein A, eine oberflächliche Proteinstruktur, die bestimmte Immunglobuline mit deren Fc-Fragment bindet. Durch diese „verkehrte“ Bindung entzieht sich das Bakterium der Opsonierung, und damit auch der Phagozytose.

### 2.1.1.2 Invasine

Der Unterhaltung und weiteren Ausbreitung der Infektion dienen Enzyme wie Proteasen, Lipasen und Elastasen, die in der Lage sind, Wirtsgewebe zu zerstören und so eine weitere Infektionsausbreitung zu begünstigen. Sie werden auch als Invasine bezeichnet.

Panton-Valentine-Leukozidin (PVL) ist ein vor allem bei den community associated MRSA (caMRSA) (siehe Abschnitt 2.2.4) nachgewiesener Virulenzfaktor. Das Panton-Valentine-Leukozidin ist ein aus zwei Komponenten (lukF und lukS) bestehendes porenbildendes Toxin, das hochspezifisch an die Zellwand von polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen bindet und deren Lyse herbeiführt<sup>11</sup>. Die bei PVL-positiven caMRSA häufig zu beobachtete Gewebsnekrose ist eine indirekte Folge des Leukozytenzerfalls, bei dem es zur Freisetzung hochreaktiver Sauerstoffradikale aus Lysosomen der zerstörten Leukozyten kommt<sup>12</sup>. Die Gewebsnekrose begünstigt eine tiefere Invasion der Erreger, PVL hat pathogenetisch also eine Doppelfunktion. Es schützt *S. aureus* vor dem Zugriff von Zellen des Immunsystems und begünstigt die Invasion der Erreger.

### 2.1.1.3 Virulenzfaktoren, die eine Persistenz der Erreger ermöglichen (Immunschutz und -modulation)

Zu der großen Gruppe der Virulenzfaktoren, die eine Erregerpersistenz ermöglichen gehören strukturelle Faktoren (Polysaccharidkapsel, Clumpingfaktor, Staphylokinase, Pigmente) und extrazelluläre Faktoren (Toxine, Koagulase).

Die meisten *Staphylococcus aureus*-Stämme produzieren eine Polysaccharidkapsel, die die Opsonierung der Erreger durch Antikörper und Komplementfaktoren verhindert und sie so vor der Phagozytose schützt<sup>13</sup>. Von den 11 zur Zeit bekannten Kapseltypen läßt sich bei MRSA meist der Kapseltyp 5 nachweisen<sup>14</sup>.

Bei der zur Differenzierung verschiedener Staphylokokkenspezies herangezogenen Plasmakoagulase handelt es sich um ein extrazelluläres Enzym. Ähnlich dem Mechanismus der Blutgerinnung verbindet sich die Koagulase mit Prothrombin zum sogenannten Staphthrombin, das die Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin bedingt. Das gebildete Fibrinpolymer stellt einen Schutzwall um die bei einer *S. aureus*-Infektion ins Gewebe eingedrungenen Bakterienzellen dar. Ähnliche Effekte zeigt der Clumpingfaktor, ein an die Zelloberfläche gebundenes Enzym, das ebenfalls zur Ausfällung von Fibrin führt. Der „Gegenspieler“ der Plasmakoagulase ist die Staphylokinase, die die Plasminbildung induziert und zur Fibrinolyse führt. Sie ermöglicht die Lyse des von der Koagulase gebildeten Walls und damit die Ausbreitung der Erreger. Die Bindung der Staphylokinase an von neutrophilen Leukozyten sezernierte  $\alpha$ -Defensine inhibiert zudem deren bakterizide Wirkung<sup>15</sup>.

Erst in den letzten Jahren konnten die für *S. aureus* namensgebenden Carotinpigmente als Virulenzfaktor identifiziert werden. Sie wirken als Antioxidantien und schützen die Erreger so vor den von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Immunabwehr sezernierten Wasserstoffperoxidmolekülen und Hydroxylradikalen<sup>16, 17</sup>.

Die Toxine von *Staphylococcus aureus* lassen sich nach ihrem Wirkmechanismus in die zu Porenbildung und resultierendem Zellschaden führenden Zytotoxine (z.B.  $\alpha$ -Toxin), die als Superantigene fungierenden Enterotoxine (Enterotoxine A–E, Toxic Shock Syndrome Toxin) und die zur Epidermolyse führenden Exfoliatintoxine (Exfoliatine A und B) untergliedern<sup>14</sup>. Superantigene sind die potentesten Aktivatoren menschlicher T-Zellen. Die durch die T-Zell-Aktivierung ausgelöste Immunreaktion ist überschießend und undifferenziert, sie führt im Ergebnis zu einer Immunsuppression durch Dysregulation des Immunsystems.

Small-colony variants (SCV) sind durch Mutationen entstandene Subpopulationen innerhalb eines *S. aureus*-Stammes, die sich phänotypisch durch ein langsames Wachstum und die Bildung kleiner, nichtpigmentierter und nichthämolysierender Kolonien auszeichnen. Sie produzieren nur geringe Mengen an  $\alpha$ -Hämolysin und Plasmakoagulase, sind also weniger virulent als Wildtyp-*S. aureus*<sup>18</sup>. Die niedrige Hämolysinproduktion ermöglicht ihnen die intrazelluläre Persistenz innerhalb von Wirtszellen, der Zugriffsmöglichkeit des Immunsystems oder einer antibiotischen Therapie weitgehend entzogen<sup>19</sup>. SCV können auf diese Weise über eine lange Zeit symptomlos persistieren, um bei nachlassender Immunantwort des Wirtes oder Einstellung der antibiotischen Therapie zum schnellwachsenden und virulenten Wildtyp-*S. aureus* zurückzukehren.<sup>20</sup> Diese Besonderheiten können zu chronischen oder rezidivierenden, antibiotikaresistenten *S. aureus*-Infektionen führen.

Eng mit den sogenannten „Plastikinfektionen“ zusammenhängend ist die mikrobielle Biofilmbildung von *S. aureus*. Ein Biofilm ist eine Ansammlung von Bakterienzellen, fest verbunden mit einer festen Oberfläche (z.B. einem Katheter) und eingebettet in eine meist von den Bakterien produzierten Matrix; bei *S. aureus* besteht die Matrix überwiegend aus Polysacchariden<sup>21</sup>. Erreger, die in einen Biofilm eingebettet sind, wachsen langsamer und sind durch die Matrix für Antibiotika nur schwer zugänglich.<sup>22</sup> Wahrscheinlich führen beide Mechanismen zu der inhärenten Antibiotikaresistenz, die Biofilme vermitteln.<sup>23</sup>

Die Einteilung anhand der pathogenetischen Funktion der Virulenzfaktoren hat didaktische Vorzüge, ist aber schematisch. Virulenzfaktoren zeigen ein komplexes Zusammenspiel, eine strenge Trennung nach pathogenetischer Rolle fällt in vivo oft schwer. Zudem besteht einerseits hinsichtlich der pathogenetischen Funktion verschiedener Virulenzfaktoren von *S. aureus* Redundanz, andererseits können einzelne Virulenzfaktoren mehrere verschiedene pathogenetische Funktionen haben.

#### **2.1.1.4 Expressionsregulation der Virulenzfaktoren**

Die Ausprägung von Virulenzfaktoren variiert qualitativ und quantitativ. Beispielsweise bilden unterschiedliche *S. aureus*-Stämme differierende MSCRAMMs aus und rufen so unterschiedliche Infektionen hervor<sup>8</sup>. Die Expression der meisten Virulenzfaktoren wird über ein komplexes System interagierender Regulatorsysteme gesteuert. Die genetische Entschlüsselung des *S. aureus*-Erbguts hat zwei Hauptgruppen regulatorischer Systeme

erkennen lassen: (1) Die sogenannten *two-component regulatory systems* (TCRS), von denen sich im *S. aureus*-Genom insgesamt 16 finden lassen<sup>24</sup> und als deren wichtigster Vertreter der *accessory gene regulator (agr)* gilt und (2) die Familie der *staphylococcal accessory regulator locus proteins (sarA)*.<sup>25, 26</sup> Die Regulationsmechanismen ermöglichen es *S. aureus*, die putativen Virulenzfaktoren an äußere Wachstumsbedingungen (z.B. pH-Wert, Osmolarität) und Zielgewebe angepasst zu exprimieren.<sup>24</sup>

## **2.1.2 Erkrankungen durch *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* ist ein opportunistischer Erreger, der bei gesunden Personen selten zu einer Infektion führt. Die pathogene Potenz wird in der Regel nur wirksam, wenn bestimmte prädisponierende Faktoren eine Infektion erleichtern.<sup>27</sup> An erster Stelle stehen dabei eine generelle Abwehrschwäche und ein Bruch in der natürlichen äußeren Immunbarriere (z.B. durch offene Wunden oder Katheter).<sup>28</sup> Das Spektrum der Infektionen, das durch *S. aureus* hervorgerufen wird, reicht von einfachen Infektionen der Haut, die sich meist selbst limitieren, bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen der inneren Organe. Welche Erkrankung sich manifestiert ist abhängig vom Arsenal an Virulenzfaktoren des zur Erkrankung führenden Stammes und von individuellen Faktoren des Wirtes (z.B. Immunstatus). Die Erkrankungen können nach ihrer Pathophysiologie in invasive Prozesse und Toxin-vermittelte Erkrankungen eingeteilt werden.

### **2.1.2.1 Invasive *S. aureus* Erkrankungen**

Bei invasiven Infektionen gelangen die Staphylokokken meist durch Haut oder Schleimhäute ins Gewebe, wo es zu einer starken Vermehrung der Erreger kommt. Lokale Infektionen der Haut und ihrer Anhangsgebilde führen zur klassischen Abszessbildung. Erkrankungen aus dieser Gruppe sind zunächst meist oberflächlich auf die Haut und Schleimhäute begrenzt. Bei Ausbreitung der Erreger per continuitatem kann es zu tiefer gehenden Infektionen wie zum Beispiel Sinusitis oder Otitis media kommen. Sämtliche oberflächliche und tiefe Prozesse können eine lymphogene oder hämatogene Absiedelung der Erreger bedingen und so, vor allem bei einer beeinträchtigten Immunabwehr, zu einer endogenen Besiedelung anderer Organsysteme führen. Die exogene Einbringung von *S. aureus* durch Trauma oder im Zuge operativer Eingriffe kann zum Ausgangspunkt der sogenannten „Plastikinfektionen“ oder anderer, sogenannter „device-assoziiertes“ Infektionskrankheiten an in den Körper eingebrachten Fremdstoffen werden.

### 2.1.2.2 Toxin-vermittelte *S. aureus*-Erkrankungen

Ausgangspunkt ist meist der Genuss kontaminierter Lebensmittel. Die Bildung der Toxine kann exogen in den Lebensmitteln erfolgen oder endogen im Magen-Darm-Trakt. Erfolgt die Toxinbildung im Darm, so beruht dies meist auf der oralen Aufnahme sehr großer stoffwechselaktiver Keimmengen oder durch eine extreme Vermehrung der Erreger im Darm, was in Folge einer Antibiotikatherapie auftreten kann. Typische toxinvermittelte Erkrankungen sind die selbstlimitierende Staphylokokkenenteritis, aber auch Erkrankungen mit schwerwiegenden Verläufen wie das durch Exfoliativtoxine ausgelöste Staphylococcal Scalded Skin Syndrome oder das toxische Schocksyndrom, ausgelöst durch das von circa 1% der *S. aureus*-Stämme gebildete Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1).

### 2.1.3 Entwicklung der Antibiotikaresistenzen bei *S. aureus*

Nach der Entdeckung der antibakteriellen Substanz des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* durch den britischen Bakteriologen Alexander Fleming im Jahre 1928 und der geglückten Isolierung der Substanz durch Florey und Chain in den dreißiger Jahren des vergangenen Jahrhunderts war die pharmazeutische Industrie Mitte der 1940er Jahre in der Lage, ausreichend Penicillin für den klinischen Einsatz zur Verfügung zu stellen. Schon kurz nachdem Penicillin breite therapeutische Anwendung fand, wurde 1942 bei einem Krankenhauspatienten erstmals ein *Staphylococcus aureus* mit Penicillinresistenz nachgewiesen.<sup>29</sup> 1945 wurde die Aktivität einer Penicillinase als entscheidender Resistenzmechanismus identifiziert.<sup>30</sup> Anfangs beschränkte sich das Auftreten resistenter Stämme noch auf Krankenhäuser, aber schon Ende der 60er Jahre waren mehr als 80% der innerhalb und außerhalb von Krankenhäusern isolierten *S. aureus* penicillinresistent.<sup>31</sup> Dieses Muster der Resistenzentstehung, nämlich erste resistente Isolate in Krankenhäusern, mit einigen Jahren Verzögerung auch außerhalb von Krankenhäusern, lässt sich bei quasi jedem Resistenzwerb von Bakterienstämmen beobachten. Dem Problem der Antibiotikaresistenz versuchte man anfangs fast ausschließlich durch die Entwicklung neuer Antibiotika zu begegnen, gezielte krankenhaushygienische Maßnahmen zur Eindämmung der Keimausbreitung wurden äußerst selten durchgeführt, eine Surveillance resistenter Erreger auf Krankensebene war unbekannt. Aber schnell stellte *S. aureus* seine große Adaptionsfähigkeit unter Beweis. Sechs Monate nach Einführung des ersten penicillinasefesten Antibiotikums Methicillin im Jahre 1960 wurden bei einem Screening von

5000 klinischen Isolaten drei Methicillin-resistente *S. aureus* detektiert.<sup>32, 33</sup> Alle drei Isolate zeigten einen identischen Phänotyp und stammten aus einem Krankenhaus in Südengland. Schon bald ließen sich MRSA in Krankenhäusern weltweit nachweisen, mit teilweise hoher Verbreitungsgeschwindigkeit und einer steigenden Zahl nosokomialer Infektionen.<sup>34</sup>

MRSA weisen häufig Mehrfachresistenzen auf. Selbst für MRSA-Reserveantibiotika, wie z.B. das Glykopeptid Vancomycin, sind seit Ende der 1990er Jahre Resistenzen beschrieben (VRSA, siehe Abschnitt 2.2.3).

Die steigende Anzahl nosokomialer, aufgrund der Mehrfachresistenzen schwer zu behandelnder Infektionen durch MRSA hat zur Entwicklung immer neuer Antibiotika geführt. Bei vielen der neuen Substanzen zeigte sich erneut die große Adaptionsfähigkeit von *S. aureus*. Im Jahre 2000 wurde das Oxazolidinon-Antibiotikum Linezolid eingeführt, das neben anderen Gram-positiven Bakterien auch gegen MRSA/VRSA wirksam ist. Es dauerte wiederum nur ein Jahr, bis über ein erstes Linezolid-resistentes *S. aureus*-Isolat berichtet wurde.<sup>35</sup> Die erste Beschreibung eines resistenten *S. aureus*-Isolates erfolgte bei dem zur Klasse der Lipopeptidantibiotika gehörenden Daptomycin auch schon zwei Jahre nach der Einführung im Jahre 2005.<sup>36</sup>

Zur Eradikation von MRSA bei nasaler Besiedlung wird das Lokalantibiotikum Mupirocin seit 1985 eingesetzt. Auch hier steigt durch die Anwendung dieses Antibiotikums die Resistenzrate an. Über die ersten mupirocinresistenten MRSA wurde bereits 1987 aus Großbritannien<sup>37</sup>, kurze Zeit später dann auch weltweit berichtet.<sup>38-40</sup>

## **2.2 MRSA**

Wie oben beschrieben sind MRSA erstmals zu Beginn der 1960er Jahre aufgetreten. Einige Jahre später brachte die Firma Beecham auf Basis des Methicillins das lagerungsstabilere Oxacillin heraus, dessen halogensubstituierte Derivate auch heute noch Verwendung zur Therapie von Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) finden. Die Begriffe Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Oxacillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (ORSA) werden in der Literatur synonym verwendet. Bei der Resistenztestung wird heute in der Regel die Empfindlichkeit gegen Oxacillin untersucht.

## 2.2.1 Mechanismen der Methicillin-Resistenz

Methicillin wirkt über eine Bindung an die Penicillin-bindenden Proteine (PBP) in der bakteriellen Zytoplasmamembran. PBP sind Enzyme, die die Vernetzung der Peptidoglykane in der bakteriellen Zellwand katalysieren und denen somit eine entscheidende Bedeutung für Wachstum, Reproduktion und Aufrechterhaltung der zellulären Struktur zukommt.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika fungieren als Substratanaloga der PBP. Nachdem die PBP mit dem  $\beta$ -Lactam-Antibiotika einen Komplex eingegangen sind, werden Sie durch Acetylierung irreversibel inhibiert. Die Resistenz von *Staphylococcus aureus* gegen Methicillin beruht auf der Anwesenheit eines sogenannten *mecA*-Gens in der DNA, welches für ein verändertes Penicillin-bindenden Protein (PBP) kodiert, das PBP-2a oder PBP-2' genannt wird. Die Expression des *mecA*-Gens wird durch die Regulatorgene *mecR1* und *mecI* gesteuert. Das *mecR1*-Gen kodiert für ein *mecA*-Inducer-Protein, bestehend aus einer transmembranösen- und einer penicillinbindenden Domäne.<sup>41</sup> Das *mecI*-Gen kodiert einen starken *mecA*-Repressor, dessen Funktion erst in Anwesenheit von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika eingestellt wird.<sup>41</sup>  
<sup>42</sup> Bei Synthese des PBP-2a werden die regulären PBPs sukzessive durch PBP-2a ersetzt.

Das veränderte PBP2 weist eine deutlich geringere Affinität zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika auf.<sup>43,44</sup> In den letzten Jahren sind zwei weitere wichtige Mechanismen der Resistenzentstehung herausgearbeitet worden: Zum einen erfolgt die Acetylierung der PBP-2a durch die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika 1000– bis 10000- fach langsamer als bei den PBP-2.<sup>45</sup> Zum anderen weisen die Komplexe aus PBP-2a und  $\beta$ -Lactam Antibiotikum im Vergleich zu den PBP-2 stark erhöhte Dissoziationskonstanten auf, die eine Sättigung der PBP-2a mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in vivo ausschließen.<sup>45</sup> Da beide Mechanismen zusammenwirken, ist das Zeitfenster für die Acetylierung der PBP-2a, und damit für deren Inhibierung, zu klein. Eine Ursache der geringen Empfindlichkeit des PBP-2a scheint auch in dessen räumlicher Struktur zu liegen. In der Röntgenstrukturanalyse zeigt sich, dass das aktive Zentrum des Enzyms nicht offen ist und es einer Konformationsänderung bedarf, um eine Interaktion sowohl mit den Peptidoglykanen der Zellwand als auch mit den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zu ermöglichen.<sup>45</sup> Diese Konformationsänderung wird nur durch eine Bindung bestimmter Zellwandstrukturen, nicht durch Bindung des Antibiotikums erreicht, so dass das PBP-2a vor der inhibitorischen Wirkung der Antibiotika geschützt bleibt.<sup>46</sup>

Der aus *mecA*, seinen Regulatorgenen (*mecI* und *mecR1*) und einer Insertionssequenz (IS431*mec*) bestehende *mecA*-Komplex befindet sich auf einer mobilen genetischen Insel,

dem sogenannten Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec).<sup>47</sup> Es sind bisher 11 verschiedene SCCmec-Typen (SCCmec I-XI) beschrieben worden.<sup>48</sup> Die Herkunft des SCCmecI ist umstritten. Einerseits wird vermutet, dass ursprünglich Methicillin-sensible *Staphylococcus aureus* (MSSA) das SCCmecI von Koagulase-negativen *Staphylokokken* erhalten haben, und damit die ersten MRSA entstanden sind.<sup>49, 50</sup> Jüngste Theorien gehen hingegen davon aus, dass *S.aureus* das SCCmec von *Staphylococcus fleurettii*, einem Tierkommensalen, erhalten hat.<sup>51</sup> Die Exzision und Integration der SCCmec erfolgt durch eine cassette chromosome recombinase (ccr), von der bislang acht verschiedene Typen nachgewiesen wurden.<sup>48</sup> Die für die ccr codierenden Gene befinden sich auf dem Cassetten-Chromosom.<sup>50</sup> Neben differierenden Rekombinasegenen unterscheiden sich die SCCmec durch die Resistenzgene, die sie gegen nicht- $\beta$ -Lactam-Antibiotika tragen. Eine Auswahl bildet die folgende Tabelle ab.

**Tabelle 2: Ausgewählte SCCmec und vermittelte Resistenzen, nach Turlej et al.<sup>52</sup>**

SCCmec-Typ(en)	Gen	Vermittelte Resistenz
I	<i>mecA</i>	Methicillin
I, II, VIII	<i>ble</i>	Bleomycin
	<i>ant4'</i>	Tobramycin
II, VIII	<i>ermA</i>	Erythromycin
	<i>aad9/spc</i>	Streptomycin
III	<i>tet</i>	Tetracyclin
	<i>cad</i>	Cadmium
IV	<i>aacA-aphD</i>	Aminoglykoside

Typusunabhängig haben alle Genkassetten identische Insertionsstellen, das 3'-Ende (attBSCC) eines „open reading frames“ (ORF), dessen Funktion bislang unbekannt ist. Vieles spricht dafür, dass die Übertragung der zusätzlichen genetischen Information mit Mechanismen des horizontalen Gentransfers (Transformation, Konjugation, Transduktion) von einem Bakterium zum nächsten erfolgt, der genaue Weg der Übertragung ist bislang jedoch ungeklärt.<sup>50, 53</sup> Die Tatsache, dass bereits mehrere verschiedene SCCmec-Typen

verifiziert wurden, deutet darauf hin, dass die *SCCmec* unterschiedlichen Ursprungs sind und zu verschiedenen Zeitpunkten in unterschiedliche MSSA-Stämme integriert wurden. Das Antreffen verschiedener *SCCmec*-Typen innerhalb gleicher Sequenztypen (ST) macht es wahrscheinlich, dass der horizontale Gentransfer des *SCCmec* relativ häufig vorkommt.<sup>54</sup>

Die Expression des *mecA*-Gens wird durch die oben erwähnten Regulatorgene *mecRI* und *mecI* gesteuert. Die zur *mec*-assoziierten DNA gehörende Insertionssequenz *IS431* lässt sich im *SCCmec*-Komplex fast aller MRSA-Stämme finden. *IS431* ist in der Lage, assoziierte, Resistenzinformationen tragende Plasmide und Transposons, durch homologe Rekombination in das *SCCmec* zu integrieren.<sup>55</sup> Entsprechend zeigen Genkarten von MRSA, dass verschiedene Resistenzgene dicht von *IS431* flankiert werden.<sup>56</sup> *IS431* wirkt entscheidend an der Ansammlung von zusätzlichen Resistenzfaktoren und der Entstehung von mehrfachresistenten MRSA-Stämmen mit.

## **2.2.2 Level der Methicillin-Resistenz und beeinflussende Faktoren**

Nach den Richtlinien des Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) der USA ist ein *S. aureus*-Stamm als MRSA zu klassifizieren, wenn: a) sich bei ihm *mecA*-Gen nachweisen lässt oder er in der Lage ist, das Genprodukt des *mecA*-Gens, Penicillin-bindende-Proteine des Typs 2a zu synthetisieren, oder b) *mecA*-negative Stämme, die kein PBP 2a synthetisieren können, Oxacillin-MHKs von  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  aufweisen.<sup>57</sup> Ob ein *S. aureus*-Stamm eine Resistenz gegenüber Methicillin zeigt, ist abhängig von seiner genetischen Ausstattung und äußeren Faktoren. Aber auch bei *S. aureus*-Stämmen, die das *mecA*-Gen in ihr Genom integriert haben, kann die phänotypische Ausprägung der Methicillin-Resistenz von phänotypisch empfindlich bis hochresistent stark variieren. Nach genotypischer Ausstattung und phänotypischer Expression der Resistenz lassen sich MRSA in Resistenztypen einteilen, die im Folgenden erläutert werden.

### **2.2.2.1 Heterogene vs Homogene Resistenz**

Phänotypisch lassen sich bei *mecA*-positiven MRSA-Stämmen zwei Methicillin-Resistenztypen unterscheiden: homo- und heterogene Resistenz. In heteroresistenten Stämmen sind >99,9% der Zellen für niedrige Oxacillin-Konzentrationen ( $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ ) empfindlich. Eine Subpopulation in der Größenordnung 1 von  $10^{-7}$  bis  $10^{-3}$  Zellen im gesamten Stamm zeigt eine „high-level-Resistenz“ und ist in der Lage, auch bei Methicillin-

Konzentrationen  $\geq 50$   $\mu\text{g/ml}$  zu wachsen. Zwischen der Zelle mit der höchsten  $\beta$ -Lactam-Resistenz und dem Resistenzlevel der großen Mehrheit der Zellen lassen sich multiple Subpopulationen mit zwischen beiden Extremen liegenden Resistenzleveln nachweisen, so dass innerhalb eines Stammes ein praktisch kontinuierliches Resistenzspektrum entsteht.<sup>58</sup> In den relativ selten zu isolierenden homoresistenten MRSA-Stämmen ist die PBP-2a-Expression über die gesamte Population hoch, phänotypisch zeigt sich die uniforme Ausprägung einer „High-level-Resistenz“.<sup>58</sup>

Die Heteroresistenz ist der vorherrschende phänotypische Resistenztyp. Wird eine heteroresistente Population in Anwesenheit von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika im Kulturmedien bebrütet, so werden die hochresistenten Subklone eines Stammes selektiert, der MRSA-Stamm konvertiert von einem heterogenen zu einem homogenen Resistenztyp.<sup>59</sup> Die konvertierten Stämme wechseln auch nach vielfacher Passage in antibiotikafreier Nährlösung nicht zurück zur Heteroresistenz, die Konversion ist demnach (von wenigen Ausnahmen abgesehen)<sup>58, 60</sup> stabil<sup>58, 61</sup>. *mecA* positive *S. aureus* mit stark differierenden Resistenzleveln enthalten oftmals ähnliche Mengen des PBP-2a.<sup>59</sup> Dieser Umstand erklärt sich durch eine Vielzahl weiterer Gene und Faktoren, die einen Einfluss auf den Resistenzlevel haben. Dazu zählen die Regulatorgene *mecR1* und *mecI*. Mutationen im Bereich des *mecI*-Gens können zu stärkerer Expression der PBP-2a und höherem Resistenzlevel führen.<sup>62, 63</sup> Eine wichtige Rolle spielen auch Gruppen von „housekeeping genes“, die *fem* (factors essential for methicillin resistance) und *aux* (auxiliary genes) genannt werden, und die sich bei allen *S. aureus*-Wildtypstämmen finden lassen.<sup>64</sup> In den meisten Fällen übernehmen sie wichtige Funktionen bei der Peptidoglykansynthese und -verarbeitung oder haben regulatorische Funktion.<sup>65</sup> Ihre Inaktivierung oder Überexpression kann großen Einfluss auf den Resistenzlevel haben.<sup>66</sup>

Die Detektion der bei heteroresistenten MRSA nur sehr kleinen Subpopulation  $\beta$ -Lactam-resistenter Zellen innerhalb eines MRSA-Stammes ist problematisch. Neben den oben berichteten genetischen Determinanten hängt die Expression der  $\beta$ -Lactam-Resistenz entscheidend von den äußeren Wachstumsbedingungen ab. Bekannte äußere Einflussgrößen sind: Inkubationstemperatur,<sup>67</sup> Inkubationszeit,<sup>68</sup> Kulturmedium,<sup>69, 70</sup> Inokulummenge,<sup>71</sup> Osmolarität,<sup>72, 73</sup> pH-Wert.<sup>74</sup>

Die Nichtberücksichtigung dieser Faktoren kann zu falsch-negativen Ergebnissen beim phänotypischen Nachweis von MRSA im Labor führen. Werden bestimmte Faktoren im Nachweisverfahren allerdings gezielt im Sinne einer Förderung der Resistenzausprägung

eingesetzt, wie es bei Referenzmethoden nach CLSI oder DIN (z.B. hinsichtlich Temperatur, Osmolarität und Inkubationsdauer) der Fall ist, können sie die Sensitivität und Spezifität phänotypischer Nachweisverfahren erhöhen.

### 2.2.2.2 Resistenzlevel und Borderline-Resistenz

Hinsichtlich des Ausprägungsgrades der Resistenz wird zwischen „low level-resistenten“ MRSA, mit einer MHK für Oxacillin zwischen 2–8 µg/ml, und „high level-resistenten“ MRSA mit einer MHK für Oxacillin >8 µg/ml unterschieden. Davon zu unterscheiden ist das Phänomen der Borderline-Oxacillin-Resistenz (BORSA). Phänotypisch zeigen die Borderline-Oxacillin-resistenten *S.aureus* eine Oxacillin-MHK von 1–8 µg/ml und liegen damit genau an oder knapp über der Empfindlichkeitsgrenze nach CLSI, ohne dass sich bei ihnen das *mecA*-Gen als genetisches Korrelat der Resistenz nachweisen ließe. Sie sind also nicht in der Lage, das *mecA*-Genprodukt PBP 2a zu synthetisieren, haben aber alternative Resistenzmechanismen ausgebildet. Ausgehend von der Beobachtung, dass in vitro die  $\beta$ -Lactam-Empfindlichkeit nach Zugabe von Penicillinase-Inhibitoren (Clavulansäure, Sulbactam) wieder zunimmt, wird eine Penicillinase-Überproduktion als einer der Borderline-Empfindlichkeit zugrundeliegenden Mechanismen angesehen.<sup>75</sup> Die Entdeckung eines weiteren Resistenzmechanismus begann 1989, als in einer Arbeit erstmals über einen Stamm *mecA*-negativer BORSA mit PBP berichtet wurde, die geringere Penicillinbindungskapazität aufwies.<sup>76</sup> Spätere Studien konnten in mehreren *mecA*-negativen BORSA-Stämmen Punktmutationen in der Sequenz der PBP 2 Gene nachweisen, die Aminosäuresubstitutionen in der Transpeptidase-Domäne der PBP 2 auslösten.<sup>77, 78</sup> Nach Plasmid-vermittelter Expression der veränderten PBP 2 bei *S. aureus* RN6390 (Wildtyp *S. aureus*) stieg die Oxacillin-MHK von 0,25 auf 4 µg/ml an, was die Punktmutationen als BORSA-Resistenzmechanismus bestätigte.<sup>77</sup>

### 2.2.3 Multiresistenz bei MRSA

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* zeigen neben der obligaten Resistenz gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika im Vergleich zu Methicillin-suszeptiblen sehr viel häufiger Parallelresistenzen gegen weitere Antibiotika und Chemotherapeutika verschiedener Klassen. Die Parallelresistenzen beruhen auf dem Erwerb zusätzlicher genetischer Informationen durch Transposons und Plasmide oder auf Veränderung bestehenden genetischen Materials durch Punktmutationen, Deletionen oder Rearrangements.<sup>79</sup> Die Resistenzinformationen durch

Genstransfer sind dabei meist eng an die SCCmec Einheiten gebunden, so dass Isolate mit unterschiedlichen SCCmec unterschiedliche Resistenzprofile aufweisen.<sup>80</sup>

In den späten 1970er-Jahren wurden erstmals MRSA mit zusätzlicher Resistenz gegen Aminoglykosid-Antibiotika beschrieben.<sup>81</sup> Unterstützt durch einen anhaltend hohen Selektionsdruck durch verbreitete Verschreibung von Antibiotika entwickelten sich in den folgenden Jahrzehnten Resistenzen gegen weitere Substanzklassen. Heute erstrecken sich die Resistenzen neben Penicillinen und Aminoglykosiden auf Lincosamide, Makrolide, Tetracycline, Fluorochinolone, Sulfonamide und weitere Substanzklassen. Eine Übersicht über die Resistenzsituation in Deutschland gibt die folgende Tabelle, die Daten des nationalen Referenzzentrums für Staphylokokken aus Krankenhausinfektionen der vergangenen Jahre wiedergibt.

**Tabelle 3: Häufigkeiten des Auftretens von Resistenzen gegen Indikatorsubstanzen für Antibiotikagruppen zusätzlich zur Resistenz gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika 2006-2011<sup>82</sup>**

Antibiotikum	2006 (%)	2007 (%)	2008 (%)	2009 (%)	2010 (%)	2011 (%)
<b>Ciprofloxacin</b>	93,8	95,8	91	90	86	93
<b>Moxifloxacin</b>	n.b.	94,4	89,6	87	86	91,3
<b>Erythromycin</b>	72,5	75	80,7	67	65	64,2
<b>Clindamycin</b>	65,4	72	73,4	60	59	59,9
<b>Gentamicin</b>	13,3	9,8	10,5	9,5	5,3	4,4
<b>Oxytetracyclin</b>	7,4	6,8	7,3	8	6	4,6
<b>Rifampicin</b>	2,5	1,97	0,4	1,6	0,8	1,7
<b>Cotrimoxazol</b>	3,1	2	10,8	5,3	0,8	0,7
<b>Fusidinsäure-Natrium</b>	6,4	3,8	2	5,2	4	2,7
<b>Fosfomycin</b>	3,3	0,56	1,1	0,15	0,6	0,4
<b>Linezolid</b>	0,04	0,11	0,1	0,1	0,08	0
<b>Tigecyclin</b>	0	0	0	0	0,08	0
<b>Daptomycin</b>	0	0	0,65	1,3	1,6	2,1

Antibiotikum	2006 (%)	2007 (%)	2008 (%)	2009 (%)	2010 (%)	2011 (%)
<b>Mupirocin</b>	2,6	3,3	5,3	4,0	4,6	6,9
<b>Vancomycin</b>	0	0	0	0	0,08	0
<b>Teicoplanin</b>	0	0	0	0	0,2	0,1

n.b. = nicht bekannt

Als ausgesprochen problematisch wird dabei die Resistenz gegen die seit über 30 Jahren als Reserveantibiotika gegen mehrfachresistente MRSA eingesetzten Glykopeptide gesehen. Parallel zu dem Ansteigen der MRSA-Prävalenz nahm in den 80er und 90er Jahren der Einsatz von Vancomycin rapide zu. Als Konsequenz des höheren Selektionsdruckes wurde erstmals 1997 aus Japan über Infektionen mit Vancomycin-intermediär-empfindliche Stämme von *S. aureus* (VISA) berichtet,<sup>83</sup> kurz darauf folgte ein VISA-Bericht aus Frankreich.<sup>84</sup> Eine intermediäre Vancomycinresistenz ist bei einer minimalen Hemmkonzentration für Vancomycin zwischen 8 und 16mg/l gegeben, ab 16 mg/l spricht man von Vancomycin resistenten Stämmen.<sup>57</sup> Innerhalb der nächsten Jahre ließen sich VISA-Stämme weltweit nachweisen,<sup>85, 86</sup> 1999 auch in Deutschland.<sup>87</sup> Insgesamt ist der prozentuale Anteil von VISA an klinischen MRSA-Isolaten noch gering.<sup>88, 89</sup> Der erste Bericht über eine Infektion mit Vancomycin-resistenten *S. aureus* (VRSA) folgte 2002 aus den Vereinigten Staaten.<sup>90</sup> Seitdem sind weltweit nur wenige VRSA Fälle aufgetreten. Das bisherige Muster der Resistenzentwicklung bei *Staphylococcus aureus* lässt allerdings befürchten, dass es nur eine Frage der Zeit ist, bis es weltweit und auch in Deutschland zum vermehrten Auftreten von VRSA kommt.

Hinsichtlich der Mechanismen der Vancomycinresistenz bei *S. aureus* muss zwischen VRSA und VISA differenziert werden. Die Vancomycinresistenz von VRSA beruht auf der Integration von Operons, die für bei der Peptidoglykansynthese involvierte Enzyme kodieren. Die Enzyme modifizieren die als Bindungsstelle für Glykopeptide fungierenden C-terminalen Enden der Peptidoglykane, so dass Peptidoglykane mit einer geringeren Affinität für Glykopeptide in die Zellwand integriert werden.<sup>91</sup> VRSA erhalten das Gen der Glykopeptidresistenz durch Vancomycin-resistente Enterokokken, wahrscheinlich von *Enterococcus faecalis*.<sup>92, 93</sup> Dieser Resistenztyp wird als *VanA*-Typ Resistenz bezeichnet und liegt der Mehrzahl der bislang isolierten VRSA zugrunde.<sup>94</sup>

Die Resistenz bei VISA beruht auf mehreren Faktoren: VISA weisen im Unterschied zu VSSA eine in vielen Punkten veränderte Zellwandstruktur und -charakteristik auf. Nachgewiesen wurden veränderte Muropeptide<sup>95</sup>, vermindertes Peptidoglycan Crosslinking<sup>96</sup>, eine Überexpression von PBP2 und PBP2<sup>97</sup> und eine reduzierte Expression von PBP4<sup>98</sup>. Es resultieren dickere Zellwände mit blinden Peptidoglykan-Bindungsstellen, die einen verminderten Vancomycin-Diffusionskoeffizienten und eine Sequestration von Vancomycin in der Zellwand nach sich ziehen.<sup>91, 99, 100</sup> Veränderungen wurden zudem beim Zellmetabolismus der VISA beobachtet, dabei spielt eine verminderte autolytische Aktivität eine wichtige Rolle.<sup>101</sup>

Das Phänomen der heterogenen Ausprägung von Antibiotikaresistenzen besteht auch hinsichtlich der Vancomycinresistenz (heteroresistente VISA (h-VISA)) und kann den Labornachweis von VISA und VRSA erschweren.<sup>102</sup> Die meisten der bislang als VISA identifizierten MRSA-Stämme zeigen ein heterogenes Muster der Methicillinresistenz.<sup>103</sup> Wie bei der Heteroresistenz bezüglich Methicillin besteht die Gefahr der falsch-negativen Resistenzbeurteilung mit dem Resultat einer falschen Antibiotikawahl und Therapieversagen.

Mit Sorge wird auch die bislang nur sehr vereinzelte, im Verlauf einer Behandlung eines MRSA-Infektes mit Vancomycin beobachtete parallele Resistenzentwicklung für Vancomycin und Daptomycin beobachtet.<sup>104, 105</sup> 2010 wurde ein solcher Erreger auch in Deutschland isoliert.<sup>106</sup> Die Daptomycinresistenz wird dabei, wie die intermediäre Vancomycinresistenz, durch Veränderungen der Zellwand ermöglicht und durch die Vancomycinexposition induziert.<sup>107</sup> Auch für Linezolid gibt es bereits vereinzelte Berichte über Resistenzentwicklungen.<sup>108-110</sup> Die Resistenz beruhte bei bislang berichteten Fällen auf der Übertragung eines Resistenzgenes aus einer zoonotischen Reserve<sup>111</sup> bzw. auf Mutationen in der 23S rRNA.<sup>109</sup>

#### **2.2.4 Community associated MRSA (caMRSA)**

MRSA sind seit ihrem erstmaligen Auftreten Anfang der 60er Jahre kaum außerhalb von Krankenhäusern oder Alten- und Pflegeheimen nachgewiesen worden. Dies kann wesentlich auf die bereits beschriebenen Fitnesskosten durch die Integration der *SCCmec* in das MRSA-Genom, mit resultierend sehr viel langsameren Wachstumsraten von MRSA im „antibiotikafreien“ Milieu zurückgeführt werden.<sup>112</sup>

In den 80er Jahren kam es jedoch erstmals zum Auftreten von tiefgehenden Hautinfektionen bei nationalen Minderheiten in den USA<sup>190</sup> und in Australien<sup>191</sup>, die auf einer Infektion mit Methicillin-resistenten Staphylokokken beruhte und bei der sich keine Beziehung zu Krankenhäusern oder Alten- und Pflegeheimen zurückverfolgen ließ. Zur Abgrenzung wurden die im Krankenhausumfeld auftretenden MRSA-Erreger hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (haMRSA) genannt, die innerhalb bestimmter sozialer Gemeinschaften anzutreffenden Erreger community-associated methicillin-resistant-*Staphylococcus aureus* (caMRSA).

Nach zunächst nur sporadischem Auftreten mehrten sich Ende der 90er Jahre weltweit Berichte über caMRSA. Neben die amerikanischen und australischen Ureinwohner traten mit Kindern, Sportlern, homosexuellen Männern und verarmten Erwachsenen in innerstädtischen Bereichen eine Vielzahl weiterer caMRSA-Risikogruppen.<sup>113</sup> In den USA sind caMRSA für ca. 50% aller Haut- und Weichgewebeeinfektionen, die durch *Staphylococcus aureus* verursacht sind, verantwortlich, und sind damit Hauptursache dieses Infektionstyps.<sup>114</sup> Die Palette der klinischen Manifestation von caMRSA-Infektionen reicht von den am häufigsten anzutreffenden Haut- und Weichgewebeeinfektionen bis zu lebensbedrohlichen Verläufen bei nekrotisierender Pneumonie und Fasciitis.<sup>115, 116</sup>

In den USA werden Erreger der klonalen Linien ST8 („USA300“) am häufigsten isoliert. caMRSA vom Typ „USA 300“ zeigen einige charakteristische molekulare Merkmale. Dazu zählen: Multilocus-Sequenztyp (MLST) ST8, *spa*-Sequenztyp t008, Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec) des Typs IV.<sup>113</sup> Zudem besitzen sie die zur Bildung von Panton-Valentin-Leukozidin befähigenden Gene *lukS-PV* und *lukF-PV*, ein auf einem SCC-Element lokalisiertes Gen-Cluster für den Argininabbau (arginine catabolic mobile element ACME) sowie durch *msrA* (Efflux) und *mphB* kodierte Makrolidresistenz.<sup>117</sup> Typischerweise sind caMRSA empfindlich für Clindamycin und andere nicht  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.

Die Linie „USA 300“ hat sich mittlerweile weltweit verbreitet,<sup>118</sup> seit dem Jahre 2005 kommt es auch in der Bundesrepublik zu deren sporadischem Auftreten.<sup>119</sup> In Deutschland und Europa ist das molekulare Bild der isolierten caMRSA jedoch insgesamt heterogener. Am häufigsten werden in klinischen Proben neben dem caMRSA „USA300“ Erreger der klonalen Linien ST30 und ST80 („European caMRSA“) und ST22 isoliert.<sup>82, 120</sup> Der ebenfalls in Deutschland erfolgte Nachweis weiterer klonaler Linien ließ sich oftmals mit einem Aufenthalt in Endemiegebieten bestimmter klonaler Linien in Verbindung bringen, so für

ST772 („Bengal Bay Clone“) im indischen Raum oder ST5 in Südosteuropa.<sup>82</sup> Da caMRSA zunehmend auch innerhalb von Krankenhäusern isoliert werden und als Verursacher von Sepsen auftreten, wird vorgeschlagen, von der „klassischen“ Unterscheidung nach Krankenhausassoziation abzugehen und sich zur Abgrenzung an den molekularen Unterschieden zu orientieren.<sup>113, 121</sup>

### **2.2.5 Livestock-associated MRSA (laMRSA)**

In den vergangenen Jahren ist MRSA zunehmend auch zu einem veterinärmedizinisch bedeutsamen Keim geworden. Besiedelungen und Infektionen sind von Pferden<sup>122</sup>, Kühen<sup>123</sup>, Hunden und Katzen<sup>124</sup>, Kaninchen<sup>125</sup> und weiteren Haus- und Nutztieren bekannt<sup>124</sup>. Die Besiedelung von Mastschweinen stellt dabei ein zentrales Problem dar.<sup>126-128</sup> Eine Übertragung der ganz überwiegend dem multilocus sequence type (ST) 398 angehörenden Isolate auf Schweinefarmer und Veterinäre ist häufig.<sup>129, 130</sup> Die epidemische Potenz der laMRSA zur Ausbreitung von Mensch zu Mensch ist geringer als die von haMRSA;<sup>131</sup> dennoch sind die laMRSA-Stämme mittlerweile in Gebieten intensiver Schweinemast häufig in regionalen Krankenhäusern anzutreffen und stellen ein eigenständiges MRSA-Reservoir dar.<sup>132</sup> Über einen ersten nosokomialen Ausbruch eines laMRSA wurde 2008 aus den Niederlanden berichtet.<sup>133</sup>

### **2.2.6 MRSA-Typisierungsmethoden, epidemische MRSA-Klone**

Populationen bakterieller Erreger bestehen typischerweise aus einer großen, heterogenen Gruppe von Isolaten, die nur selten als Krankheitserreger in Erscheinung tritt, und einer kleinen Gruppe eng verwandter Stämme, die sich häufig im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten nachweisen lassen.<sup>134</sup> Dieses Muster lässt sich auch bei *S. aureus* wiederfinden, mit einigen wenigen weltweit vertretenen MRSA-Linien, die sich in Krankenhäusern sowie Alten- und Pflegeheimen aufgrund von Fitnessvorteilen klonal verbreiten konnten. Bei einem lokal begrenzten Ausbruch einer MRSA-Infektion stellen sich aus epidemiologischer Sicht immer zwei zentrale Fragen: Gehören die isolierten MRSA einem gemeinsamen Stamm an oder sind sie verschiedenen Ursprungs (sogenannte lokale Epidemiologie), und in welchem Verhältnis stehen sie zu weltweit isolierten Erregern derselben Gattung (globale Epidemiologie). So ist es möglich, für jeden MRSA-Einzelfall abgestufte, evidenzbasierte Entscheidungen über Hygienemaßnahmen zu treffen. Weiterhin ist die Typisierung auch eine gute Kontrolle für die Wirksamkeit von Hygienemaßnahmen, da

sie zeigt, ob sich ein importierter Klon innerhalb des Krankenhauses ausbreitet. Zur Klärung dieser Fragen werden molekularbiologische Typisierungsverfahren herangezogen. Die früher mangels Alternativen verwendeten phänotypischen Typisierungsverfahren (Typisierung durch Antibiogramm, Phagentypisierung) haben deutliche Schwächen hinsichtlich der Trennschärfe, mit der einzelne Stämme voneinander abgegrenzt werden können.<sup>135</sup> In den 80er Jahren wurde daher mit der Entwicklung genotypischer Nachweismethoden begonnen.

### 2.2.6.1 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

In diesem 1984 vorgestellten Verfahren wird die gesamte chromosomale DNA des Bakteriums mit selten schneidenden Restriktionsenzymen gespalten und anschließend in einem Agarosegel durch ein sich regelmäßig änderndes elektrisches Feld aufgetrennt.<sup>136</sup> Anhand der Ähnlichkeitsbeurteilung der sich im Agarosegel zeigenden Bandenmuster kann auf Verwandtschaftsbeziehungen geschlossen werden und eine Zuordnung zu epidemischen MRSA-Klonen erfolgen. Tenover et al haben für die Zuordnung von Verwandtschaftsverhältnissen in Ausbruchssituationen Kriterien erarbeitet, die sich als internationaler Standard durchgesetzt haben.<sup>137</sup> Nach Tenover werden vier Grade der Verwandtschaft unterschieden. Isolate mit identischem Bandenmuster fallen in die Kategorie „ununterscheidbar“. Isolate, deren PFGE-Muster sich in zwei bis drei Banden unterscheiden, werden der Kategorie „eng verwandt“ zugerechnet. Isolate, deren PFGE-Muster sich in vier bis sechs Banden unterscheiden, werden der Kategorie „möglicherweise verwandt“ zugeordnet. Wird ein Isolat letzterer Kategorie in einer Ausbruchssituation gefunden, ist die Zugehörigkeit des Isolats zum Ausbruch zwar eher unwahrscheinlich, vor allem bei großen Ausbrüchen, die sich über lange Zeiträume erstrecken, aber dennoch möglich. Isolate, deren PFGE-Muster sich in sieben oder mehr Banden vom Ausbruchsstamm unterscheiden, werden der Kategorie „nicht verwandt“ zugeordnet.

**Tabelle 4: Kriterien für die Interpretation von PFGE-Mustern nach Tenover<sup>137</sup>**

Kategorie	Typische Anzahl Fragmentunterschiede
<b>Ununterscheidbar</b>	0
<b>Eng verwandt</b>	2-3
<b>Möglicherweise verwandt</b>	4-6
<b>Nicht verwandt</b>	≥7

Die PFGE ist eine der ersten molekularen Typisierungsmethoden und auch heute noch eine der am weitesten verbreiteten. Die Methode kam in der vorliegenden Studie zur Anwendung.

#### **2.2.6.2 Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST)**

MLST<sup>134</sup> basiert auf der Sequenzierung sieben sogenannter „housekeeping“-Gene von *S. aureus*. Die entsprechenden Genabschnitte müssen vor der Sequenzierung mittels PCR vervielfältigt werden. Die Sequenzierung ergibt für jedes der housekeeping-Gene eine bestimmte Sequenz, die Allel genannt wird. Alle sieben Gensequenzen zusammen ergeben unmittelbar ein genetisches Profil, allelisches Profil genannt. Die allelischen Profile einzelner Isolate können mit denen schon sequenzierter und in der internetbasierten MLST-Datenbank gespeicherter Erreger verglichen werden.<sup>138</sup>

Stämme mit der gleichen Allelkombination aller sieben Genloci werden zu einem Sequenzier-Typ (ST) zusammengefasst. Isolate, die eine identische Sequenz in mehr als fünf Genloci aufweisen, werden als zu einem klonalen Komplex („clonal complex“ (CC)) zugehörig eingeordnet. Bislang sind 2422 verschiedene Sequenzientypen nachgewiesen worden.<sup>138</sup> Bei einer in Oxford durchgeführten MLST-Sequenzierung von 912 internationalen MRSA-Isolaten ließen sich elf hauptsächlich vertretene MRSA-Klone gleichen Sequenzientyps nachweisen, die sich wiederum fünf klonalen Komplexen (CC8, CC5, CC45, CC22 und CC30) zuordnen ließen.<sup>54, 139</sup> Diese Untersuchung hat zu einer Vereinheitlichung der Bezeichnung international epidemischer MRSA geführt. MRSA-Klone werden nach ihrem MLST- und SCCmec-Typen in der Form ST-Typ – Resistenz-Phänotyp (MRSA, MSSA, VISA oder VRSA) – SCCmec-Typ benannt.<sup>54</sup>

Die Multi-Locus-Sequenzierung eignet sich gut für die Darlegung evolutionärer Zusammenhänge und die präzise Zuordnung zu klonalen Linien. Das MLST liefert in 24–48 Stunden ein Ergebnis.

#### **2.2.6.3 Single-Locus-Sequenz-Typisierung (spa-Typisierung)**

Mitte der 90er Jahre wurde die DNA-Sequenzierung eines bestimmten Genabschnittes des Protein A-Gens als Typisierungsverfahren vorgeschlagen (*spa*-Typisierung).<sup>140</sup> Die *spa*-Typisierung erfolgt mittels Sequenzanalyse des hochvariablen Bereiches (x-Region) innerhalb des *S. aureus* Protein A-Gens (*spa*) nach dessen vorausgegangener Amplifizierung durch PCR. Die X-Region zeichnet sich durch kurze, sich wiederholende Sequenzabschnitte („Repeats“) aus.<sup>140</sup> Die Repeats unterscheiden sich durch die Anzahl vorhandener Basenpaare

(21–27 Paare) und durch die Reihenfolge, in der die einzelnen Basen kombiniert sind.<sup>140</sup> Die insgesamt große Variabilität der Repeats entsteht durch Deletions- oder Insertionsereignisse oder durch Punktmutationen.<sup>141</sup> Einzelne Repeats bekommen eine eigene Repeatnummer zugewiesen, z.B.:

GAG GAA GAC AAC AAA AAA CCT GGT = Repeatnummer r26, 24bp

AAA GAA GAC AAC AAG CCT GGT = Repeatnummer r44, 21bp

MRSA-Stämme unterscheiden sich in der Anzahl und der Kombination verschiedener Repeats. Der *spa*-Typ wird entsprechend aus der Anzahl der Repeats und der Aneinanderreihung der Repeatidentifikationsnummern zusammengesetzt, z.B.:

*spa*-Typ t003 : r26-r17-r20-r17-r12-r17-r17-r16

*spa*-Typ t458 : r26.

Für eine automatisierte Auswertung der DNA-Sequenzdaten wurde eine Software entwickelt, die in der Lage ist, automatisch Sequenzen einzulesen, Repeatmuster zu erkennen und den *spa*-Typ zuzuweisen. Typisierungsergebnisse können mit einem Internetserver (<http://www.spaServer.ridom.de>) abgeglichen werden, um eine einheitliche Nomenklatur für neu auftretende *spa*-Typen zu vergeben. Die softwarebasierte Typisierung ermöglicht auch eine Zuordnung der *spa*-Typen zu den durch MLST festgelegten klonalen Linien.<sup>142</sup>

Bei zumindest gleichwertiger Diskriminationsfähigkeit hat die *spa*-Typisierung gegenüber dem MLST die Vorteile niedrigerer Kosten und eines geringeren Arbeitsaufwandes.<sup>142, 143</sup> Die *spa*-Typisierung wird allgemein als kostengünstige, reliable und valide Methode zur Charakterisierung von *Staphylococcus aureus* Isolaten empfohlen.<sup>142, 144</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die *spa*-Typisierung genutzt.

Die folgende Abbildung zeigt die zehn seit Bestehen des Ridom-*spa*-Servers am häufigsten synchronisierten *spa*-Typen.

**Tabelle 5: Die zwanzig am häufigsten mit dem Ridom-*spa*-Server synchronisierten Isolate, MLST-Typen und kommentierende Informationen (Stand: 02.11.2017).**

<i>spa</i> -typ	Frequenz	MLST	Kommentar
t032	10.49 %	ST-22	Barnim MRSA (prototype & subclone), EMRSA-15, prototype of ST-22, CC22
t003	08.98 %	ST-5, ST-225	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone
t002	06.80 %	ST-5, ST-231	CC5, Rhine Hesse MRSA (prototype), EMRSA-3, New York clone, Japan clone, Pediatric, USA100 ORSA II, USA800 ORSA IV, ST 5 ORSA I
t008	06.06 %	ST-8, ST-247, ST-250, ST-254	CC8, Northern German MRSA (subclone), USA300 ORSA IV (cMRSA in the US), Archaic/Iberian, ST250 ORSA I
t011	03.27 %		
t127	02.45 %	ST-1	
t084	01.72 %	ST-15, ST-18	
t034	01.97 %		
t012	01.58 %	ST-30	
t037	01.21 %	ST-239, ST-240, ST-241	CC8/239, Vienna MRSA, Brazilian/Hungarian, ST239 ORSA III, ST240 ORSA III, EMRSA-1, -4, -7, -9, -11
t015	01.06 %	ST-45	
t019	01.03 %	ST-30	
t021	01.00 %	ST-30, ST-33, ST-55	CC30, prototype of ST-30, cMRSA (lukS-lukF +) widely disseminated in Australia
t091	00.91 %	ST-7	
t044	00.88 %	ST-80	cMRSA (lukS-lukF +) widely disseminated in Europe
t022	00.81 %	ST-22	CC22, EMRSA-15
t437	00.74 %		
t067	00.73 %		
t045	00,71 %		
t024	00.67 %	ST-8	

An der jüngsten europaweiten MRSA-Surveillancestudie nahmen 357 Labore in 26 Ländern teil.<sup>145</sup> Es wurden 2890 Isolate (MRSA und MSSA) einbezogen, die als Erreger invasiver Infektionen in Erscheinung getreten waren. Unter den MRSA-Isolaten wurden 155 verschiedene *spa*-Typen nachgewiesen. Die in der Studie dominierenden *spa*-Typen gibt die folgende Tabelle wieder.

**Tabelle 6: Dominierende *spa*-Typen einer multizentrischen, europaweiten Surveillancestudie<sup>145</sup>**

<i>spa</i> Typ	MLST	Frequenz	Prozent
<b>t032</b>	ST-22a	140	14,50%
<b>t008</b>	ST-8a (ST-247, ST-250, ST-254)	120	12,40%
<b>t041</b>	ST-111a, ST-228a	72	7,40%
<b>t003</b>	(ST-5) ST-225a	71	7,30%
<b>t002</b>	ST-5a, ST-231a	62	6,40%
<b>t067</b>	ST-5a, ST-125a	50	5,20%
<b>t001</b>	(ST-5, ST-222) ST-228a	30	3,10%
<b>t037</b>	ST-239a (ST-240), ST-241a	27	2,80%
<b>t030</b>	ST-239a (ST-246)	20	2,10%
<b>t024</b>	ST-8a	14	1,40%
<b>t190</b>	ST-8a	14	1,40%
<b>t515</b>	ST-22a	12	1,30%
<b>t038</b>	ST-45a	12	1,20%
<b>t022</b>	ST-22a	11	1,10%
<b>t740</b>	ST-45a	11	1,10%
<b>t012</b>	ST-30a	9	0,9%
<b>t015</b>	ST-45a	9	0,9%
<b>t044</b>	ST-80a	9	0,9%
<b>t045</b>	ST-5a (ST-225)	8	0,8%
<b>t127</b>	ST-1a	8	0,8%
Andere	—	258	26,60%

Neben den endemischen MRSA-Linien (pandemic clones) werden noch „minor clones“, die auf ein umgrenztes geographisches Gebiet begrenzt sind, und „sporadic clones“, die nur bei einem oder wenigen Patienten isoliert werden konnten, unterschieden.<sup>139</sup> Die endemischen MRSA sind dabei nicht unbedingt die virulentesten Erreger, haben aber Vorteile hinsichtlich der Fähigkeit, bei einem Wirt zu persistieren, sich zu multiplizieren und auf andere Wirte zu übertragen.<sup>146</sup>

## 2.2.7 Prävalenz von MRSA in Krankenhäusern in Europa

Nach zunächst nur sporadischem Auftreten konnten sich Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme weltweit durchsetzen und treten mit steigender Inzidenz auf. In Deutschland stieg der Anteil von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen an klinischen *S. aureus*-Isolaten laut den von der Paul-Ehrlich-Gesellschaft durchgeführten PEG-Resistenzstudien von 15,2% (1998) über 20,7% (2001)<sup>147</sup> auf 22,6% (2004)<sup>5</sup>. 2007 zeigte sich erstmals ein Rückgang resistenter Isolate auf einen Anteil von 20,3%.<sup>148</sup> Die Daten von 2010 belegen einen weiteren Rückgang auf 16,7%<sup>106</sup>.

Die Erhebungen des 1999 vor dem Hintergrund wachsender Herausforderungen durch pathogene Keime ins Leben gerufenen European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARS-Net), welches seit 2009 vom European Center for Disease Control (ECDC) geführt wird und europaweit Daten zur MRSA-Prävalenz in Krankenhäusern sammelt, zeigen für Deutschland in den jährlichen Veröffentlichungen einen kontinuierlichen Anstieg der Oxacillin-resistenten Isolate von *S. aureus* aus Blutkulturen und Liquor zwischen 1999 mit 8,3% auf 21,4% im Jahre 2005<sup>149</sup>. 2006 fiel die Rate erstmals seit Beginn der Erhebungen auf den Wert von 20%<sup>150</sup>. In den folgenden Jahren zeigte sich eine fallende Tendenz, so konnte nach Anstieg auf 20,8% in 2010<sup>151</sup> ein Rückgang auf 16,8% in 2015<sup>152</sup> verzeichnet werden. Vom ECDC werden aus den erhobenen Daten Trends bezüglich der Prävalenz einzelner Erreger berechnet. Für die Zeitspanne 2012 bis 2015 wurde bezüglich klinischer MRSA-Isolate dabei in einem von 30 Ländern eine signifikant steigende Tendenz errechnet (Slowakei), eine signifikant fallende Tendenz ergab sich für sieben Länder (Belgien, Frankreich, Deutschland, Irland, Polen, Portugal, Großbritannien). In sieben Ländern ließen sich 2015 Prävalenzraten von über 25% nachweisen.<sup>153</sup>

**Figure 3.22. *Staphylococcus aureus*. Percentage (%) of invasive isolates with resistance to meticillin (MRSA), by country, EU/EEA countries, 2015**

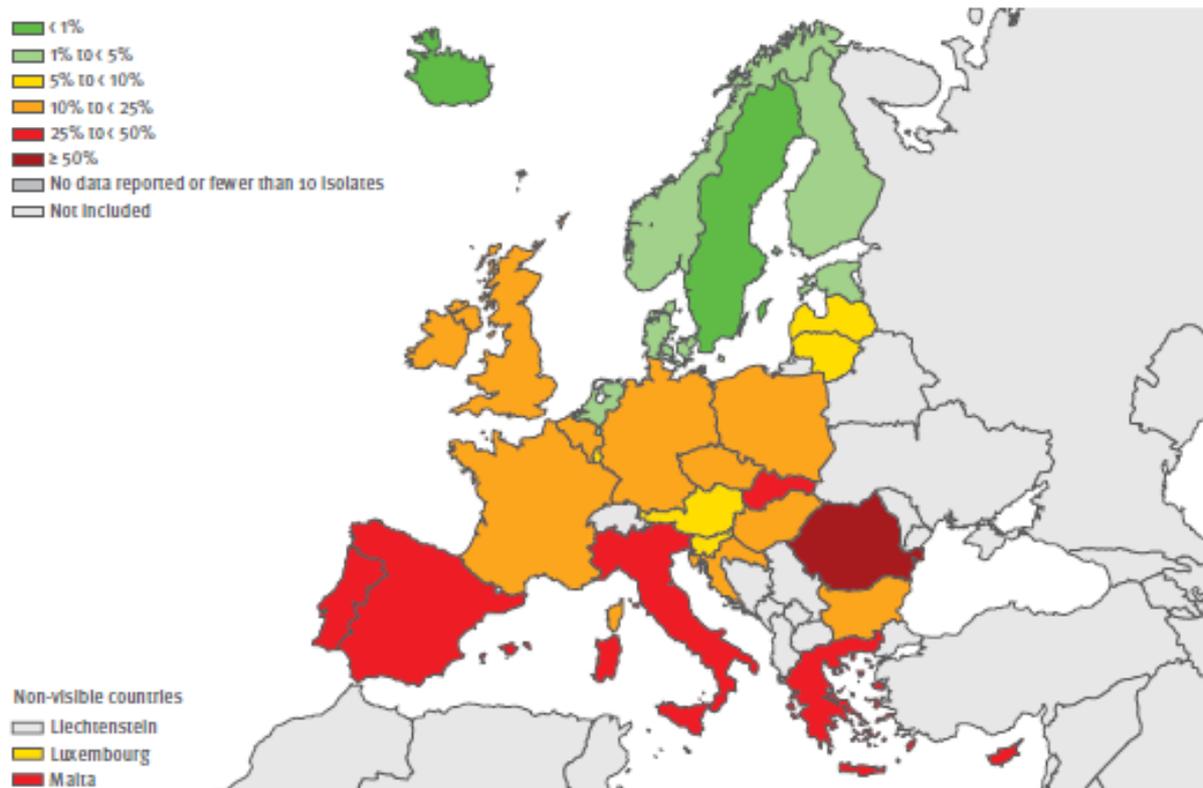


Abbildung 1: Anteil Oxacillin-resistenter Isolate von *Staphylococcus aureus* aus Blutkulturen und Liquor der am EARS-Net teilnehmenden Länder 2015 (aus EARS-Net Annual Report 2015)<sup>152</sup>

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein verbessertes MRSA-Management auf Krankenhausebene in sinkenden Prävalenzen resultiert.<sup>154-156</sup> Mittlerweile sind in vielen Kliniken Managementstrategien für nosokomiale Keime implementiert worden, deren zentraler Bestandteil oftmals ein MRSA-Screening bei Aufnahme des Patienten darstellt. Die wachsende Sensibilisierung spiegelt sich auch in der steigenden Partizipation von Kliniken am Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) des Nationalen Referenzzentrums für Surveillance nosokomialer Infektionen (NRZ) wieder. Die von den Kliniken an das NRZ übermittelten Daten belegen zwischen 2004 und 2010 einen durchgehenden Anstieg der Gesamt-Inzidenzdichte der MRSA-Fälle (Anzahl der MRSA-Fälle pro 1000 Patiententage) von 0,63 (2004) auf 1,16 (2010)<sup>157-163</sup>. Ab dem Jahre 2011 wurde aus den übermittelten Daten die Gesamtprävalenz errechnet (Anzahl MRSA-Fälle pro 100 Patienten). 2011 lag diese bei 0,89, zwischen 2012 und 2015 schwankte der Wert zwischen 0,98 und 1.<sup>164-167</sup> 2016 ließ sich erstmals ein deutlicher Rückgang auf 0,95 feststellen.<sup>168</sup> Die Daten des MRSA-KISS geben zudem Hinweise auf die zunehmende Belastung von Krankenhäusern durch den Import von

MRSA und damit auf die zunehmende Wichtigkeit von MRSA-Pools außerhalb von Krankenhäusern. So stieg die Inzidenzdichte nosokomialer MRSA-Fälle (Anzahl der nosokomialen MRSA-Fälle pro 1000 Patiententage) zwar zunächst von 0,23 (2003) auf bis 0,27 (2006) an,<sup>157-159, 169</sup> in den folgenden Jahren zeigten sich jedoch bis auf 0,11 (2016) sinkende Raten.<sup>160-163, 168, 170</sup> Parallel konnte zwischen 2004 und 2010 ein kontinuierlicher Anstieg der MRSA-Prävalenz bei Aufnahme (Anzahl der Patienten mit MRSA bei Aufnahme pro 100 Patienten) von 0,33 (2004) auf 1,32 (2010) festgestellt werden,<sup>157-163</sup> 2016 lag dieser Wert bei 0,87<sup>168</sup>. Die vom ECDC als stabil beziehungsweise leicht rückläufig bewertete europäische Prävalenzsituation der vergangenen Jahre zeigt einerseits, dass der medizinischen Herausforderung von MRSA mit einer verbesserten Surveillance wirksam begegnet werden kann. Die weiterhin hohen Prävalenzen in vielen süd- und osteuropäischen Ländern unterstreichen andererseits die Notwendigkeit flächendeckender Surveillancestrategien unter Einbeziehung aller Bereiche des Gesundheitswesens (Akutkrankenhäuser, Heim- und Pflegeeinrichtungen sowie Einrichtungen der ambulanten Versorgung).

## 2.2.8 Prävalenz von MRSA in Heim- und Pflegeeinrichtungen

In Deutschland sind bislang neun Studien zur MRSA-Prävalenz in Alten- und Pflegeheimen durchgeführt worden. Die Reichweite der Studien variiert dabei erheblich, so wurden Bewohner von einer bis 61 Einrichtungen untersucht. Die ermittelten Prävalenzraten reichen dabei von 0,26% bis 26%. Die Studienlage für Deutschland gibt die folgende Tabelle wieder.

**Tabelle 7: MRSA-Prävalenz in Heim- und Pflegeeinrichtungen in Deutschland**

Studienjahr	Anzahl untersuchter Bewohner	Anzahl besuchter Heime	Prävalenzrate (%)
1999 <sup>171, 172</sup>	1324 359	31 7	2,4 2,2
2001 <sup>173</sup>	33 34	1 1	21 26
2002 <sup>174</sup>	1057	61	3
2003 <sup>175, 176</sup>	390 500	9 3	0,26 0
2004 <sup>177</sup>	65	3	9
2008 <sup>178</sup>	265	5	2,3
2011 <sup>179</sup>	1827	34	7,6
2016 <sup>180</sup>	2858	65	4,8

Die geringe Zahl an Studien und deren regionale Begrenztheit erschweren die detaillierte und vergleichende Interpretation der gemessenen Prävalenzen. Betrachtet man die in lediglich einem Heim durchgeführte Studie mit ungewöhnlich hoher endemischer MRSA-Verbreitung als Ausreißer, lässt sich über den Beobachtungszeitraum eine Tendenz zu steigenden MRSA-Prävalenzraten konstatieren. Die jüngste der zitierten Studien von Nillius et al hat eine MRSA-Prävalenzrate von 4,8% feststellen können.<sup>180</sup>

Auch auf internationaler Ebene ist die Studienzahl sehr begrenzt. Die ermittelten Prävalenzraten schwanken zwischen 0% und 40,3%.

**Tabelle 8: MRSA-Prävalenz in Alten- und Pflegeeinrichtungen international**

Land	MRSA-Prävalenz in Alten- und Pflegeeinrichtungen nach Studienlage (%)
Vereinigte Staaten von Amerika <sup>181-183</sup>	20,6-58
Frankreich <sup>184</sup>	37,6
Nordirland <sup>185</sup>	23,3
Großbritannien (ohne Nordirland) <sup>186-188</sup>	0,14-22
Belgien <sup>189</sup>	19,9
Spanien <sup>190, 191</sup>	10,6-16,8
Irland <sup>192</sup>	8,6-10,1
Slowenien <sup>193</sup>	8,8-9,3
Italien <sup>194</sup>	7,8
Türkei <sup>195</sup>	5
Niederlande <sup>182, 196, 197</sup>	0-4,2
Schweden <sup>198, 199</sup>	0
Hong Kong <sup>200</sup>	21,6

Eine graphische Übersicht gibt folgende Abbildung:

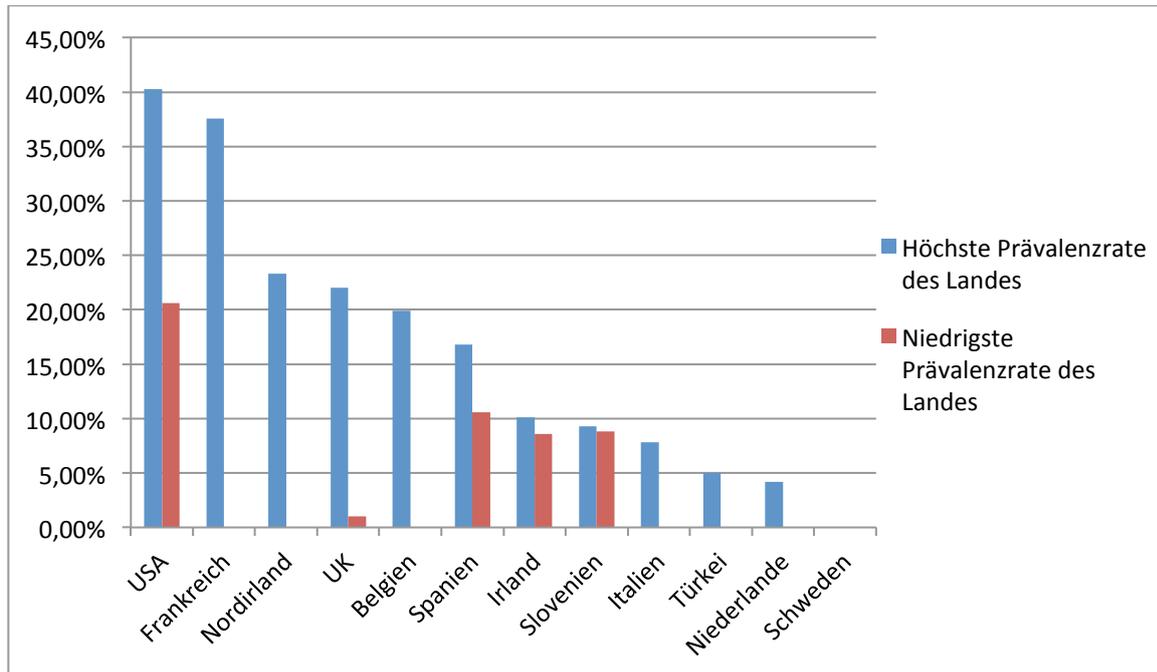


Abbildung 2: Prävalenzraten von MRSA-Prävalenzstudien in Alten- und Pflegeheimen international

Die MRSA-Prävalenzen in Heimeinrichtungen liegen oftmals über denen in Krankenhäusern der gleichen Region. Charakteristisch für Alten- und Pflegeheime ist dabei ein hoher MRSA-Besiedelungsgrad der Bewohner bei zugleich niedrigen auf MRSA zurückzuführenden Morbiditäts-, Mortalitäts- und Infektionsraten.<sup>174, 201</sup> Diese Konstellation erklärt, warum Alten- und Altenpflegeheime als Reservoir für MRSA-Stämme fungieren. Nicht eindeutig zu beantworten ist dabei die Frage, ob mehr Altenheimbewohner MRSA in die Krankenhäuser bringen oder umgekehrt.<sup>202</sup>

## 2.2.9 Prävalenzraten bei Pflegekräften in Heim- und Pflegeeinrichtungen

Bei den wenigen deutschen Studien zur Prävalenz von MRSA bei Pflegekräften in Heim- und Pflegeeinrichtungen wurden Prävalenzraten von 0%<sup>172</sup> beziehungsweise 0,5%<sup>174</sup> nachgewiesen. In internationalen Studien wurden Prävalenzen von 7%<sup>203</sup> und 7,5%<sup>185</sup> festgestellt. Darüber hinaus existieren mehrere Fallberichte zu endemischen Ausbrüchen in einzelnen Heimen.<sup>204-206</sup>

## 2.2.10 Folgen der MSSA- und MRSA- Besiedelung und -Infektion

### 2.2.10.1 Medizinische Folgen

Eine Besiedelung mit *Staphylococcus aureus* (vom Methicillin-sensiblen Typ) hat sich in verschiedenen Untersuchungen als Risikofaktor für Infektionen erwiesen, häufig anzutreffen sind Infektionen der Haut, Katheterinfektionen, Pneumonien und Sepsen.<sup>7</sup> Im Vergleich zum Methicillin-sensiblen Typ birgt eine Besiedelung mit MRSA nochmals ein um den Faktor vier erhöhtes Risiko, an einer invasiven Infektion mit *Staphylococcus aureus* zu erkranken.<sup>207</sup> Die Infektionstypen entsprechen dabei den durch MSSA verursachten Infektionen.

Umstritten ist, ob MRSA virulenter als MSSA sind. Eine Auswertung zu dieser Fragestellung erhobener Daten ist schwierig, da von MRSA-Infektionen betroffene Patienten oftmals kränker und älter als MSSA-Patienten sind, und Antibiotika und Chemotherapeutika, die zur MRSA-Therapie geeignet sind, häufig weniger effizient als die für MSSA erhältlichen Therapeutika sind bzw. effektive Therapieregime bei MRSA-Infektionen oftmals erst nach einer therapeutisch relevanten Latenz (z.B. bedingt durch die Bearbeitungszeit bis zum Nachweis eines MRSA) eingesetzt werden.<sup>208</sup> In einigen Studien, u.a. nach den Ergebnissen des nationalen deutschen Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS), wurde eine erhöhte Mortalität von MRSA-Infektionen beobachtet<sup>209-211</sup>, wohingegen in anderen Studien keine erhöhte Sterblichkeit festgestellt wurde.<sup>212, 213</sup> Eine weitere Studie konnte lediglich für MRSA-Sepsen eine erhöhte Mortalität feststellen, nicht jedoch für MRSA-Pneumonien.<sup>214</sup> In einem Reviewartikel von Gordon et al. wurde vertreten, dass es aktuell keine zwingenden Beweise für eine generell höhere Virulenz von MRSA gegenüber MSSA gibt.<sup>8</sup> Jüngste Untersuchungen weisen auf eine geringere Virulenz durch „Fitnesskosten“ aufgrund einer mit der Expression des *mecA*-Gens einhergehenden, reduzierten Fähigkeit zur Expression zytolytischer Toxine<sup>215</sup> oder eines veränderten Biofilms hin.<sup>216</sup>

Unabhängig von der Frage der Virulenz erweist sich die zunehmende Entwicklung von Parallelresistenzen gegen nicht- $\beta$ -Lactam-Antibiotika als problematisch. Noch wirksame Therapeutika sind oftmals im Nebenwirkungsprofil ungünstig, individuelle Vorerkrankungen des Patienten können die Anzahl in Frage kommender Medikamente zusätzlich einschränken.

### 2.2.10.2 Ökonomische Folgen

Unbestritten ist, dass MRSA-Besiedelungen und MRSA-Infektionen neben den medizinischen Konsequenzen ein erhebliches ökonomisches Problem darstellen. Die erhöhten Kosten der Besiedelung ergeben sich insbesondere aus der oben erwähnten höheren Infektionsrate mit konsekutiv längerer Verweildauer, aber auch Antibiotikakosten und Kosten für zusätzliche diagnostische Maßnahmen spielen eine Rolle. Zudem verursachen die bei MRSA-Besiedelung empfohlenen Maßnahmen<sup>217</sup> wie Personalschulung, Kontaminationschutz, Einzelzimmerunterbringung und Kontaktisolierung, Desinfektion und Reinigung sowie Sanierung und Transport Betroffener erhebliche Kosten.

Eine finnische Studie beziffert die Gesamtkosten eines 14-monatigen MRSA-Ausbruchs in der inneren Medizin und Chirurgie auf insgesamt 1.585.870 Euro.<sup>218</sup> Nach einer in Deutschland durchgeführten Studie beliefen sich die durch zusätzliche Hygienemaßnahmen entstehenden Kosten auf einer chirurgischen Station auf 9261 Euro pro Patient.<sup>219</sup> In einer kanadischen Studie wurden lediglich zusätzliche Kosten in Höhe von 1363 US-Dollar pro Patient ermittelt,<sup>220</sup> eine französische Studie ergab zusätzliche Kosten von 1480 US-Dollar pro Patient.<sup>221</sup> Im Vergleich zu MSSA-Infektionen führen MRSA-Infektionen gemäß mehrerer Untersuchungen bei unterschiedlichen Patientenkollektiven zu durchweg höheren Zusatzkosten.<sup>211, 222-224</sup>

Ein Vergleich dieser Daten ist schwierig, da die Dauer des Krankenhausaufenthaltes je nach Aufnahmegrund und Allgemeinzustand des Patienten erheblich variieren kann. Die Kosten sich vor dem Hintergrund unterschiedlicher Abrechnungs- und Gesundheitssysteme addieren, sich, je nach Land, die durchzuführenden Hygienemaßnahmen unterscheiden<sup>221</sup> und die Studiendesigns zur Berechnung der attribuierbaren Kosten stark differieren.<sup>225</sup>

In mehreren Studien konnte hingegen unabhängig vom nationalen Hintergrund und bei unterschiedlichen Studiendesigns die Kosteneffizienz einer „search and destroy“- Strategie im Umgang mit MRSA in Krankenhäusern nachgewiesen werden.<sup>226-229</sup>

In einer im Jahre 2003 veröffentlichten Studie zu zusätzlichen Kosten durch MRSA-Infektionen im Bereich von Pflegeheimen erwiesen sich diese um den Faktor 1,95 höher als bei Infektionen mit MSSA.<sup>230</sup>

## 2.3 Fragestellung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Häufigkeit des Auftretens von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Alten- und Pflegeheimen des Saarlandes, im Stadtverband Saarbrücken, untersucht.

In den teilnehmenden Einrichtungen wurde bei sämtlichen in die Untersuchung einwilligenden Bewohnern, bei entsprechendem Wunsch auch beim Pflegepersonal, eine MRSA-Screeninguntersuchung durchgeführt. Von Bewohnern, bei denen in dieser Untersuchung eine Besiedelung mit MRSA festgestellt wurde, wurden MRSA relevante Daten erfasst. Schließlich wurden die so gewonnenen MRSA-Isolate mittels phänotypischer und molekularbiologischer Methoden typisiert.

Die Auswertung der Daten ermöglicht die Erfassung und Bewertung patientenindividueller Faktoren, die zu einer MRSA-Besiedelung bzw. -infektion beitragen. Darüber hinaus können anhand der anamnestischen Daten der Heimbewohner und der Typisierungsergebnisse Übertragungswege des MRSA innerhalb der Einrichtungen sowie zwischen den Einrichtungen und regionalen Kliniken identifiziert werden.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Studiendesign**

Die Studie wurde als Querschnittsstudie zur Erfassung der Prävalenz von *Staphylococcus aureus* und MRSA bei Bewohnern von Alten- und Pflegeheimen im Stadtgebiet Saarbrücken durchgeführt. Die Einrichtungen wurden zunächst schriftlich ausführlich über die geplante Studie informiert, aufkommende Fragen wurden per e-mail beziehungsweise telefonisch beantwortet. Die Mitwirkung beziehungsweise Teilnahme an der Studie war den Einrichtungen wie deren Bewohnern freigestellt.

Die Probenentnahme erfolgte zwischen Februar und Juli 2006. Bei MRSA-positiv getesteten Bewohnern wurden anschließend anamnestisch und/oder durch Einsicht in die Pflegedokumentation Informationen über bestehende Risikofaktoren erhoben.

### **3.2 Probenentnahme und Transport**

Allen teilnehmenden Bewohnern wurden mittels jeweils eines sterilen Tupfers Abstriche aus beiden Nasenvorhöfen entnommen. Bei Patienten mit bekannten Risikolokalisationen für eine MRSA-Besiedelung (Katheter, Sonden, offene Wunden) wurden von den entsprechenden Stellen zusätzliche Proben genommen, jeweils mit einem neuen Tupfer. Die Entnahme der Proben erfolgte durch den berichtenden Doktoranden. Dem Personal der Einrichtungen wurde ein MRSA-Screening angeboten, das Untersuchungsmaterial wurde bei gewünschter Untersuchung durch Selbstentnahme einer Tupferprobe aus den Nasenvorhöfen gewonnen. Die Proben wurden nach Entnahme innerhalb von 48 Stunden in sterilen Plastikröhrchen in das Mikrobiologische Institut der Universität des Saarlandes transportiert und dort unverzüglich verarbeitet.

### **3.3 Bakteriologische Untersuchungen**

Gewonnene Proben wurden im Direktausstrich auf Mannitol-Kochsalz-Agar gebracht und 48–72 Stunden bei 35°C in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Auf dem Selektivmedium für Staphylokokken und Mikrokokken wachsen koagulasepositive Staphylokokken typischerweise in Form gelb pigmentierter Kolonien mit gelben Vorhöfen. Entsprechende Kolonien wurden anschließend auf MRSA-Chromagar subkultiviert (Firma Becton Dickinson, Heidelberg) und wiederum 48-72 Stunden unter oben erwähnten Bedingungen

inkubiert. Von den sich auf dem Medium malvenfarben darstellenden MRSA wurden reichlich Kolonien in eine Tryptic-Soy-Bouillon verbracht und nach 48 bis 72-stündiger Inkubation auf Müller-Hinton-Agar (Nährbodenküche des Mikrobiologischen Instituts) geplattet. Nach 48 bis 72-stündiger Inkubierung der Agarplatten bei 35°C in 5%iger CO<sup>2</sup>-Atmosphäre wurde ein Agardiffusionstest durchgeführt. Anzucht, Isolierung und Agardiffusionstestung wurden vom Doktoranden ausgeführt.

### 3.4 Empfindlichkeitsprüfung gegenüber relevanten Antibiotika

Wie oben erwähnt erfolgte die Empfindlichkeitsprüfung der isolierten Stämme gegenüber Antibiotika durch einen Agardiffusionstest (Methode nach Bauer-Kirby-Sherris-Turk). Die mit den MRSA-Isolaten homogen beimpften und anschließend bebrüteten Müller-Hinton-Agarplatten wurden mittels eines Antibiotikaplättchendispenser mit Antibiotikaplättchen bestempelt. Es folgte eine erneute 24 bis 48-stündige Inkubation, anschließend wurden die Durchmesser der Hemmhöfe erfasst und nach der folgenden Tabelle die Resistenzen bestimmt.

**Tabelle 9: Liste der überprüften Antibiotika bzw. Chemotherapeutika und Resistenzkriterien nach CLSI, 2006**

Antibiotikum (Abkürzung)	Durchmesser des Hemmhofes in mm		
	resistent	intermediär	sensibel
<b>Ampicillin/Sulbactam (SAM)</b>	≤14	15-20	≥22
<b>Ciprofloxacin (CIP)</b>	≤15	16-20	≥21
<b>Clindamycin (CC)</b>	≤14	15-20	≥21
<b>Erythromycin (E)</b>	≤13	14-22	≥23
<b>Doxycyclin (D)</b>	≤12	13-15	≥16
<b>Gentamicin (GM)</b>	≤12	13-14	≥15
<b>Levofloxacin (LVX)</b>	≤19	20-21	≥22
<b>Oxacillin (OX)</b>	≤10	11-12	≥13
<b>Penicillin (P)</b>	≤28		≥28
<b>Sulfamethoxazol-Trimetoprim (SXT)</b>	≤17	18-21	≥22
<b>Teicoplanin (TEC)</b>	≤10	11-13	≥14
<b>Vancomycin (VA)</b>	≤14		≥15

### **3.5 Stammservierung**

Direkt vom Müller-Hinton-Agar wurde von MRSA-positiv getesteten Bakterienstämmen mit sterilen Glasstäben reichlich Bakterienmaterial abgenommen und homogen in Cryobank-Röhrchen (Fa. Mast Diagnostica Laboratoriums-Präparate GmbH, Reinfeld) eingebracht. Die Röhrchen wurden anschließend bei -80°C eingelagert.

### **3.6 Molekularbiologische Untersuchungen (Pulsfeldgelelektrophorese und *spa*-Typisierung)**

Molekularbiologische Untersuchungen wurden zur Schonung von Laborressourcen bei lediglich 49 der 114 MRSA-positiven Isolaten durchgeführt. Zur Anwendung kamen die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und die *spa*-Typisierung.

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden im Labor des Mikrobiologischen Instituts der Universität des Saarlandes durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt den Herren Dierk Bauer und Thomas Konz für die technische Durchführung der Untersuchungen der PFGE sowie Herrn Professor Lutz von Müller für die Vornahme der *spa*-Typisierung. Die Durchführungsprotokolle der PFGE und der *spa*-Typisierung finden sich im Anhang dieser Arbeit.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Teilnehmer

Von den 19 im Stadtgebiet Saarbrückens befindlichen Alten- und Pflegeheimen erklärten sich 13 (68,4%) Häuser mit zum Erhebungszeitraum insgesamt 1639 Bewohnern zur Mitwirkung bereit. Von diesen konnte bei 1350 (82,4%) eine Probenentnahme erfolgen. Neben einer verweigerter Teilnahme lag diese Reduktion der Gruppengröße an Beurlaubungen, ambulanten Arztbesuchen oder anderweitig zu erklärender Abwesenheit der Bewohner.

**Tabelle 10: An der Studie teilnehmende Einrichtungen in der Reihenfolge ihrer Größe und Bewohner beziehungsweise Teilnehmer**

Einrichtung	Bewohner	Teilnehmer	Teilnehmer/Bewohner (%)
Einrichtung 1	421	411	98,60
Einrichtung 2	207	173	83,60
Einrichtung 3	199	110	55,10
Einrichtung 4	139	105	75,50
Einrichtung 5	120	91	75,80
Einrichtung 6	99	94	95
Einrichtung 7	99	54	54,50
Einrichtung 8	86	76	88,40
Einrichtung 9	85	68	80
Einrichtung 10	72	64	88,90
Einrichtung 11	50	47	94
Einrichtung 12	38	36	94,70
Einrichtung 13	24	21	87,50
Summe/Mittelwert	1639	1350	82,40

### 4.2 Prävalenz

Bei der Untersuchung von insgesamt 1350 Heimbewohnern wurden insgesamt 114 Bewohner positiv auf MRSA getestet. Es resultiert eine relative Häufigkeit (Prävalenz) bezüglich aller

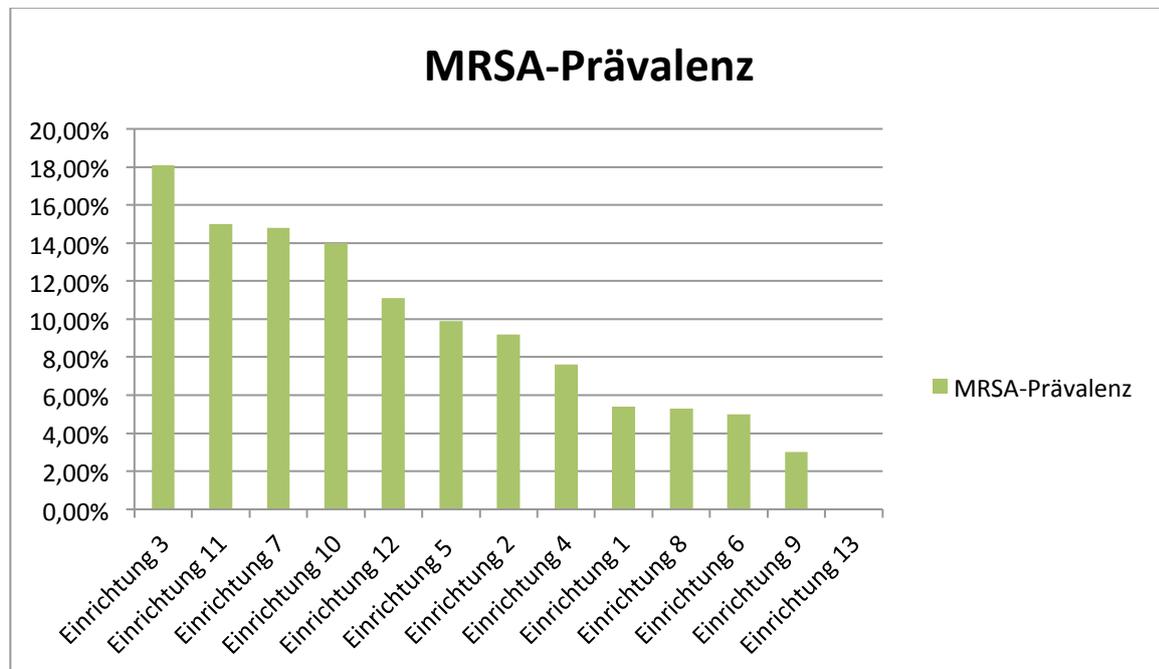
Einrichtungen von:  $\frac{114}{1350} \times 100 = 8,44\%$ .

Dabei zeigten sich zwischen den einzelnen Einrichtungen erhebliche Unterschiede in der Prävalenz. Eine Übersicht gibt die folgende Tabelle:

**Tabelle 11: MRSA-Prävalenz in den einzelnen Pflegeeinrichtungen, angeordnet in absteigender Prävalenz**

Einrichtung	Bewohner getestet	MRSA-positiv getestete Bewohner	Prävalenz (%)
Einrichtung 3	110	20	18,10
Einrichtung 11	47	7	15
Einrichtung 7	54	8	14,80
Einrichtung 10	64	9	14,00
Einrichtung 12	36	4	11,10
Einrichtung 5	91	9	9,90
Einrichtung 2	173	16	9,20
Einrichtung 4	105	8	7,60
Einrichtung 1	411	22	5,40
Einrichtung 8	76	4	5,30
Einrichtung 6	94	5	5
Einrichtung 9	68	2	3
Einrichtung 13	21	0	0,00

In graphischer Darstellung ergibt sich folgendes Bild:



**Abbildung 3: MRSA-Prävalenz in den einzelnen Heimen. Die Prävalenz ist in Prozent der untersuchten Bewohner angegeben. Die Sortierung erfolgte absteigend nach der Prävalenz.**

Um einen direkten Vergleich mit den in Krankenhäusern gewonnenen MRSA-Prävalenzdaten zu ermöglichen, die sich meist auf den Anteil von MRSA an der Gesamtmenge der nachgewiesenen *Staphylococcus aureus*-Isolate beziehen, wurden sämtliche Abstriche durch unmittelbares Ausbringen auf ein Selektivmedium zunächst auf *Staphylococcus aureus* untersucht. Es konnten folgende Ergebnisse dokumentiert werden:

**Tabelle 12: Häufigkeit einer MSSA-Besiedelung, geordnet absteigend nach prozentualer Häufigkeit MRSA unter MSSA-Isolaten in den einzelnen Heimen**

Einrichtung	S.a. positiv getestete Bewohner	Prozent der Bewohner	Prozent MRSA unter S. a.-Isolaten (%)
Einrichtung 11	18	38,30	39
Einrichtung 12	13	50	30,70
Einrichtung 3	77	70	26,00
Einrichtung 8	17	22,4	23,50
Einrichtung 10	40	62,5	22,50
Einrichtung 7	37	68,6	21,60
Einrichtung 4	38	36,2	21,10
Einrichtung 5	45	49,5	20,00
Einrichtung 2	84	48,6	19,00
Einrichtung 1	136	33,1	16,20
Einrichtung 9	14	20,6	14
Einrichtung 6	43	45,7	12
Einrichtung 13	4	19	0,00
Summe/Mittelwert	566	43,4	20,10

*Staphylococcus aureus* ließ sich im Mittel bei 43,3% der getesteten Bewohner nachweisen, die Prävalenz schwankte zwischen 19% und 70%. Die gemittelte Prävalenz von MRSA an allen nachgewiesenen *Staphylococcus aureus*-Isolaten lag bei 20,1%. In den einzelnen Heimen mit MRSA-Nachweis schwankten die Prävalenzen zwischen 12% und 39%.

### 4.3 Besiedlungsort und Sensitivität der Untersuchungsmethode

Bei allen Heimbewohnern wurden Abstriche aus beiden Nasenvorhöfen genommen. Bei Bewohnern mit Risikolokalisationen, beziehungsweise bekannter MRSA-Besiedlung, wurden zudem an den betreffenden Stellen weitere Abstriche genommen. Dabei ließen sich folgende Lokalisationen als MRSA-positiv dokumentieren.

**Tabelle 13: Nachgewiesene MRSA-Besiedelungsorte und deren Häufigkeit, in absteigender Häufigkeit geordnet**

MRSA positive Lokalisation	Häufigkeit	Prozentualer Anteil bezogen auf alle positiv getesteten Bewohner (n=114)
nur Nase	88	77,2%
Risikolokalisation und Nase	13	11,4%
nur Insertionsstelle Harnkatheter	4	3,50%
nur Dekubitus	3	2,60%
nur Insertionsstelle PEG-Sonde	3	2,60%
nur offene Wunde	2	1,80%
nur Auge	1	0,90%
Summe	114	100%

Die Sensitivitätsrate des Nasenscreening betrug für unsere Studienpopulation 88,6%. In Studien liegen die Sensitivitätsraten rein nasaler Abstriche zwischen 68%<sup>231</sup> und 91 %.<sup>232</sup> In einer Studie von Baker lag die prozentuale Häufigkeit einer isoliert nicht nasalen Besiedelung zwischen 1,7% (ausschließlich axilläre Besiedelung) und 3,3% (ausschließlich inguinale Besiedelung)<sup>232</sup>. Mit Prozentwerten von 0,9% (nur oculäre Besiedelung), über 1,8% (nur offene Wunde besiedelt) und 2,6% (nur Dekubitus, bzw. Sondeninsertionsstelle) bis zu 3,5% (nur Insertionsstelle Harnkatheter besiedelt) liegen die im Rahmen dieser Studie für isoliert nichtnasale Besiedelungen festgestellten Häufigkeiten im Bereich der nach Studienlage zu erwartenden Größen. Eine isoliert nichtnasale Besiedelung ließ sich bei insgesamt dreizehn Bewohnern (11,4%) nachweisen.

#### 4.4 Potenzielle Risikofaktoren und deren statistische Auswertung

In mehreren Studien konnte eine Vielzahl verschiedener Risikofaktoren einer MRSA-Besiedelung im Bereich von Alten- und Pflegeeinrichtungen herausgearbeitet werden. Am häufigsten werden dabei offene Wunden und Katheter bzw. Sonden<sup>189, 201, 233-235</sup>, Ulcera und Decubitalgeschwüre<sup>174</sup>, eine antibiotische Behandlung<sup>189, 194, 234, 235</sup><sup>174</sup>, sowie eine Behandlung mit Steroiden<sup>192</sup> und Krankenhausaufenthalte in den dem Screening vorausgegangenen Monaten<sup>174, 189, 194, 200, 233</sup> genannt. Als eigenständige Risikofaktoren zeigten sich zudem Immobilität und Hilfsbedürftigkeit<sup>189, 201, 233</sup>, eine frühere MRSA-Infektion<sup>172, 235</sup>, männliches Geschlecht<sup>172, 174, 192</sup>, hohes Alter<sup>192</sup>, das Tragen einer Endoprothese<sup>174</sup>, weitere Grunderkrankungen (genannt: Pancreatitis, Fußnekrose, Z.n. TBC)<sup>174</sup>. Weiterhin stellen nach Studienlage sowohl ein kurzer, d.h. weniger als ein Jahr andauernder<sup>172</sup>, als auch ein längerer Aufenthalt in einer Pflegeeinrichtung<sup>174</sup> eigenständige Risikofaktoren dar.

Auf der Ebene der Einrichtungen konnten eine mangelhafte bzw. fehlende MRSA-Surveillance<sup>189</sup>, fehlende Regeln zur Antibiotikatherapie<sup>189</sup>, eine wenig entwickelte Infektionskontrolle bei gleichzeitig hohem Arzt/Bewohner-Verhältnis<sup>189, 234</sup> sowie ein Aufenthalt in einer mittelgroßen Pflegeeinrichtung<sup>233</sup> als Risikofaktoren beschrieben werden.

Von den in der Literatur als Risikofaktoren beschriebenen Bedingungen sind in der vorliegenden Studie nicht alle in die Auswertung eingeflossen. Bei der Datenerhebung erwies sich die valide Erfassung der beschriebenen Parameter als sehr schwierig, da die Patienten selbst aufgrund ihres Status als medizinische Laien und der vielfach bestehenden kognitiven Defizite zu zuverlässigen Aussagen oft nicht in der Lage waren und sich auch die pflegerische Dokumentation sich in vielen Fällen als lückenhaft und wenig zuverlässig erwies. Daher wurde die Erhebung im Verlauf auf die in den folgenden Abschnitten dargestellten, vergleichsweise gut zu erfassenden Faktoren beschränkt. Bei einer kurz nach Abnahme der Abstriche verstorbenen Bewohnerin, waren die Unterlagen zur medizinisch-pflegerischen Dokumentation nicht mehr auffindbar, wichtige Informationen zum Alter, zur Dauer des Heimaufenthalts sowie zu weiteren dokumentierten Parametern fehlen daher für diese Patientin, was die Gruppengröße für einige Risikofaktoren auf N=113 dezimierte.

#### 4.4.1 Gruppierung der MRSA-Prävalenzen nach Heimen

Zur Berechnung des statistischen Datensatzes wurden die Heime nach der in dieser Untersuchung nachgewiesenen MRSA-Prävalenz in drei Gruppen unterteilt. Heime mit einer MRSA-Prävalenz zwischen 0% bis 6 % wurden in einer Gruppe niedriger Prävalenz zusammengefasst, Heime mit einer MRSA-Prävalenz zwischen 7% und 12% wurden in einer mittleren Prävalenzgruppe zusammengefasst, und Heime mit einer MRSA-Prävalenz zwischen 13 und 18% wurden einer dritten Gruppe zugeordnet. Die Abbildung 4 zeigt die allgemeine Verteilung der MRSA-Prävalenzen auf diese drei Gruppen.

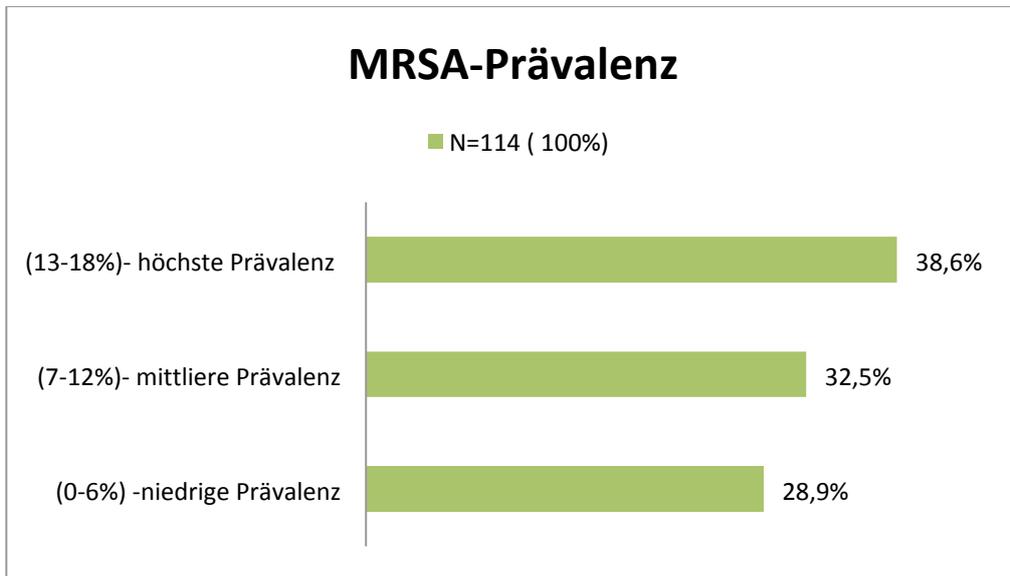


Abbildung 4: Verteilung der MRSA Prävalenzen

Von den 114 MRSA-positiv getesteten Probanden befanden sich 44 (38,6 %) in einem Heim der höchsten Prävalenzgruppe, 37 (32,5%) in einem der mittleren Gruppe und 33 (28,9%) in einer Einrichtung der niedrigsten Prävalenzgruppe.

Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der drei Prävalenzgruppen nach Heimeinrichtungen:

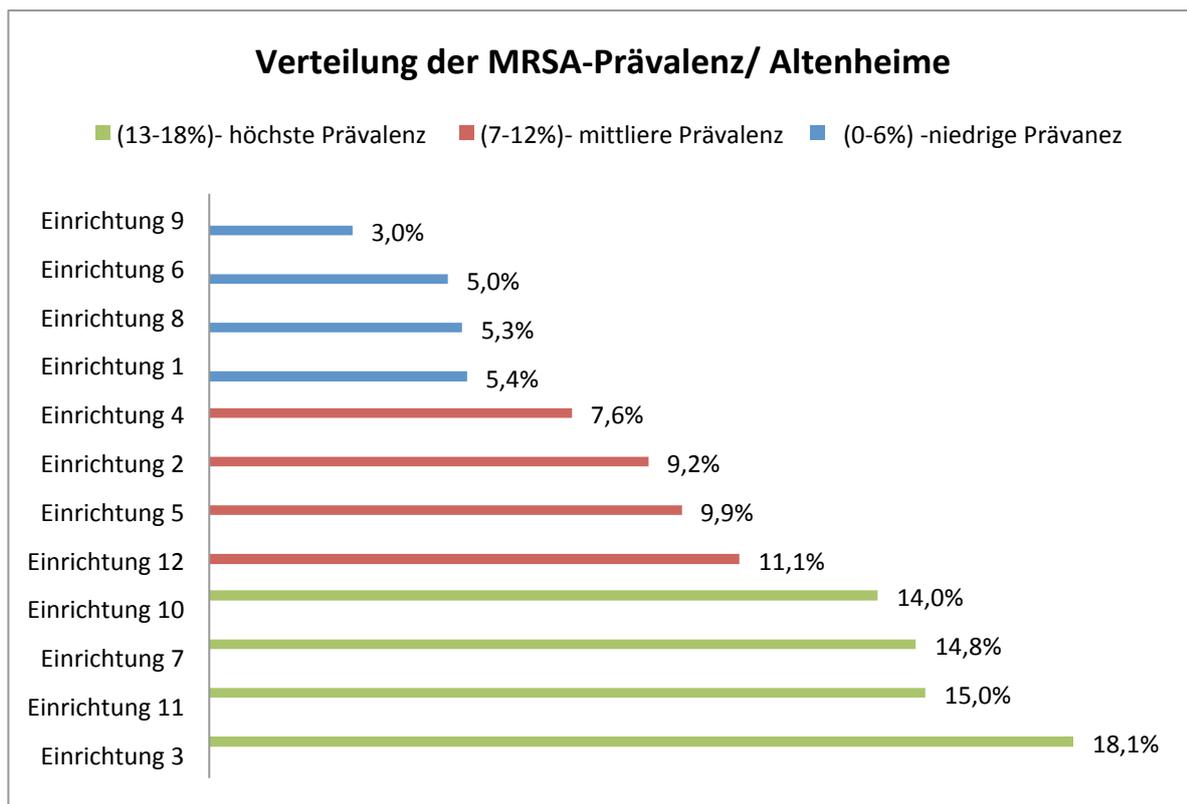


Abbildung 5: Zusammensetzung der Prävalenzgruppen nach Heimen

Die Erwartung war, dass bei Bewohnern von Einrichtungen mit einer hohen MRSA-Prävalenz häufiger das Vorliegen von den in der Literatur beschriebenen Risikofaktoren einer MRSA-Besiedlung dokumentiert ist, als in Einrichtungen mit einer niedrigen Prävalenz. Eine Bestätigung dieser Erwartung interpretierten wir als Indiz für eine das Risiko einer MRSA-Besiedlung erhöhende Eigenschaft des entsprechenden Faktors und damit für dessen Einordnung als Risikofaktor. Nachfolgend werden die Prüfungsergebnisse vorgestellt. Die Ergebnisauswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS für Windows, Version 11. Die Tabellen des SPSS-Outputs der vorgenommenen Rechnungen finden sich im Anhang dieser Arbeit.

#### 4.4.2 Altersstruktur der Probanden

Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten zum Alter der Probanden bildet die folgende Grafik ab. Zur besseren Übersichtlichkeit und Auswertbarkeit wurde das Alter der Probanden dabei in fünf Alterskategorien („50-60“, „61-70“, „71-80“, „81-90“ und „91-100“) zusammengefasst.

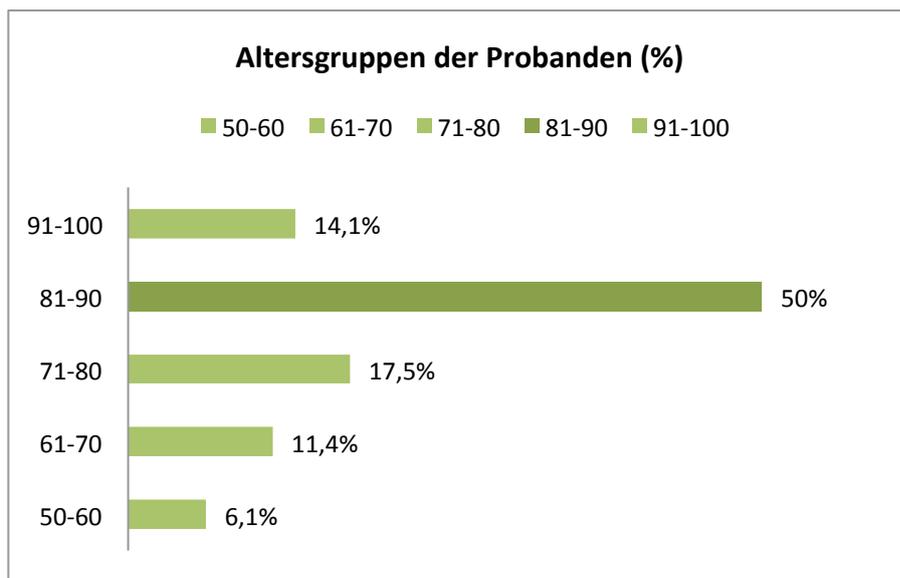


Abbildung 6: Alter der MRSA-positiven Probanden in Altersgruppen zusammengefasst, Angabe der Häufigkeit, in der getestete Bewohner den jeweiligen Gruppen zugeordnet waren, in Prozent

Unterschiede in den Prävalenzen der Heime wurden einer einfaktoriellen Varianzanalyse unterzogen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die drei Prävalenzgruppen in Bezug auf das Alter ihrer Bewohner statistisch signifikant unterscheiden. In der Prüfung auf Mittelwertunterschiede erwies sich ein positiver Zusammenhang zwischen einer hohen Prävalenzgruppe und einem niedrigen Alter:  $F(2,109) = 5,157$ ,  $p = 0,007$ .

#### 4.4.3 Dauer des Status als Heimbewohner

Da Alten- und Pflegeheime einen eigenständigen MRSA-Pool darstellen (s.o.) und eine MRSA-Übertragung in Heimen wahrscheinlich ist,<sup>236</sup> sollte geprüft werden, ob eine lange Aufenthaltsdauer in der Heimeinrichtung einen eigenen Risikofaktor einer MRSA-Besiedelung darstellt. Zur Prüfung dieser Frage wurde von MRSA-positiv getesteten Bewohnern das Datum des Einzugs in die Heimeinrichtung erhoben.

Die sich ergebenden individuellen Aufenthaltsdauern sind, zur besseren Übersichtlichkeit und Auswertbarkeit in fünf Gruppen zusammengefasst, in Abbildung 7 dargestellt. 44,7 % von 113 Probanden waren 36 Monate und länger in den Pflegeeinrichtungen.

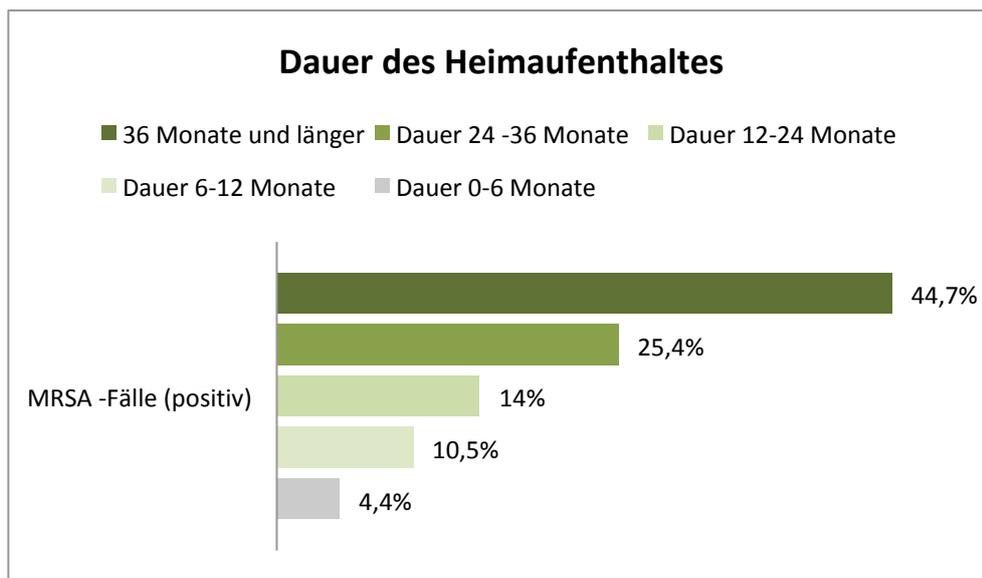


Abbildung 7: Dauer des Heimaufenthalts MRSA-positiv getesteter Probanden, Angabe der jeweiligen Gruppenstärke in Prozent

In der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigten sich im Hinblick auf die Aufenthaltsdauer der Bewohner keine signifikanten Mittelwertunterschiede bezogen auf die drei nach Prävalenz geordneten Heimgruppen. Die gewonnenen Daten geben mithin keinen Anhalt für die Einordnung der Heimaufenthaltsdauer als Risikofaktor einer MRSA-Besiedelung:  $F(2,105) = 0,449$ ,  $p = 0,640$ .

#### 4.4.4 Krankenhausaufenthalte

In vielen Studien haben sich Krankenhausaufenthalte als zentraler Risikofaktor einer MRSA-Besiedelung erwiesen.<sup>179, 193, 194, 237</sup> In dieser Studie wurden von positiv getesteten Bewohnern etwaige Krankenhausaufenthalte der vergangenen zwölf Monate, bezogen auf den Zeitpunkt der Durchführung der Studie, dokumentiert.

Von den 114 MRSA-positiv getesteten Bewohnern war bei 76 zumindest ein Krankenhausaufenthalt dokumentiert. Bei 38 MRSA-positiven Bewohnern war kein KH-Aufenthalt dokumentiert. In der Auswertung des Merkmals Krankenhausaufenthalt in den letzten zwölf Monaten mittels Kontingenztafel und Chi-Quadrat-Test ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Krankenhausaufenthaltes und der Zuordnung zu einer der Prävalenzgruppen feststellen:  $X^2(2) = 4,806$ ,  $p = 0,090$ .

Die Häufigkeit eines vorausgegangenen Krankenhausaufenthaltes bei positiv getesteten Bewohnern stellt die folgende Tabelle dar.

**Tabelle 14: Häufigkeit eines Krankenhausaufenthaltes bei MRSA-positiv getesteten Bewohnern**

Heim	Positiv getestete Bewohner mit Krankenhausaufenthalt	Positiv getestete Bewohner ohne Krankenhausaufenthalt	Prozentsatz der MRSA-positiven Bewohner mit Krankenhausaufenthalt
Einrichtung 3	9	11	45,00%
Einrichtung 11	5	2	71,42%
Einrichtung 7	4	4	50,00%
Einrichtung 10	4	5	44,44%
Einrichtung 12	4	0	100,00%
Einrichtung 5	8	1	88,88%
Einrichtung 2	10	6	62,50%
Einrichtung 4	6	2	75,00%
Einrichtung 1	15	7	68,18%
Einrichtung 8	2	2	50,00%
Einrichtung 6	5	0	100%
Einrichtung 9	1	1	50%

Es fällt auf, dass unter den vier Heimen mit der höchsten MRSA-Prävalenz (die vier erstgenannten Einrichtungen der obigen Tabelle) bei drei Einrichtungen die Anzahl besiedelter Bewohner mit Krankenhausaufenthalt in den zwölf Monaten vor dem Screening bei 50% oder weniger liegt, die Anzahl der MRSA-positiven Bewohner ohne einen Krankenhausaufenthalt entsprechend vergleichsweise hoch ist. Dies könnte ein Hinweis auf lokale Ausbrüche in den jeweiligen Einrichtungen sein.

#### 4.4.4.1 Häufigkeit eines Krankenhausaufenthaltes

Brugnaro et al. hatten die Häufigkeit eines Krankenhausaufenthaltes als Risikofaktor einer MRSA-Besiedelung ausgemacht.<sup>194</sup> Unter den MRSA-positiven Heimbewohnern der vorliegenden Studienpopulation hatten, bezogen auf die letzten 12 Monate vor dem Screening, 41 Bewohner keinen Krankenhausaufenthalt, 55 einen Aufenthalt, 17 zwei und ein Bewohner keinen Krankenhausaufenthalt.

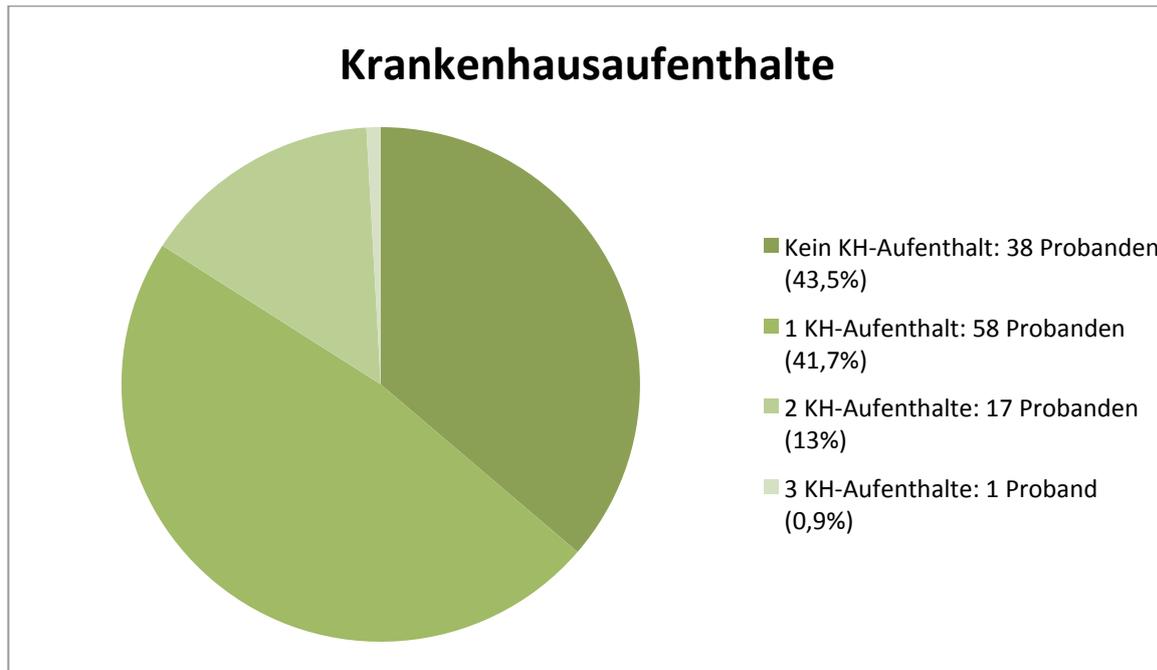


Abbildung 8: Anzahl der Krankenhausaufenthalte MRSA-positiver Bewohner in den 12 Monaten vor dem Screening

Die statistische Auswertung der Daten mittels Kontingenztafel und Chi-Quadrat-Test ergab keine Abhängigkeiten zwischen der Häufigkeit eines Krankenhausaufenthaltes und der Zuordnung zu den drei Prävalenzgruppen:  $X^2(6) = 11,944$ ,  $p = 0,063$ .

#### 4.4.4.2 Gesamte Aufenthaltsdauer im Krankenhaus

Ein längerer Krankenhausaufenthalt wurde bereits früh als Risikofaktor für den nosokomialen Erwerb einer MRSA-Besiedelung beschrieben.<sup>238</sup> Daher wurde bei MRSA-positiven Heimbewohnern die Dauer der einzelnen Krankenhausaufenthalte erfasst. Die dokumentierten Gesamtaufenthaltsdauern bewegen sich dabei zwischen null und 63 Tagen. Bei einer Probandin mit einem Aufenthalt im Krankenhaus ließ sich die Aufenthaltsdauer der vorliegenden Dokumentation nicht entnehmen.

Die statistische Auswertung des Merkmals Gesamtaufenthaltsdauer der Heimbewohner im Krankenhaus in den letzten zwölf Monaten mittels einfaktorieller Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Gesamtaufenthaltsdauer und den drei Prävalenzgruppen:  $F(2,110) = 0,982$ ,  $p = 0,378$ .

#### 4.4.4.3 Aufenthalt in einzelnen Krankenhäusern

Neben der Anzahl der Aufenthalte und der gesamten Aufenthaltsdauer im Krankenhaus wurden in der vorliegenden Studie die aufnehmenden Krankenhäuser dokumentiert.

Die folgende Tabelle gibt wieder, wie viele der MRSA-positiven Heimbewohner sich während der letzten zwölf Monate in der jeweiligen Klinik befunden haben.

**Tabelle 15: Krankenhausaufenthalte MRSA-positiver Heimbewohner**

Krankenhaus	MRSA-positive Heimbewohner mit stationärem Aufenthalt	Prozentualer Anteil (n=114)
Klinik 1	28	24,6%
Klinik 2	25	25%
Klinik 3	18	15,8%
Klinik 4	4	3,5%
Klinik 5	3	2,6%
Klinik 6	3	2,6%
Klinik 7	3	2,6%
Klinik 8	2	1,8%
Klinik 9	2	1,8%
Klinik 10	1	0,9%
Klinik 11	1	0,9%
Klinik 12	1	0,9%

Die drei erstgenannten Kliniken setzen sich in der Häufigkeit stationärer Aufenthalte positiv auf MRSA getesteter Probanden deutlich ab. Informationen zu MRSA-Besiedlungsraten der Kliniken sind nicht bekannt. Eine Auswertung der geographischen Lage der Kliniken aus Tabelle 15 ergibt, dass mit zunehmender Entfernung vom Stadtzentrum Saarbrückens die Häufigkeit eines stationären Aufenthalts der erfassten Probanden abnimmt. Die drei Kliniken mit den häufigsten Aufenthalten liegen von allen genannten Kliniken am dichtesten am

Stadtzentrum. Daher kann trotz der festgestellten Häufung von stationären Aufenthalten MRSA-positiver Bewohner dieser Studie in den erstgenannten Kliniken mit den zur Verfügung stehenden Daten nicht auf eine Kausalität im Sinne einer Risikoerhöhung geschlossen werden.

#### 4.4.5 Pflegestufe

Pflegestufen werden im Wesentlichen orientiert am täglichen Grundpflegebedarf hilfsbedürftiger Personen vergeben und bilden somit den vorbeschriebenen Risikofaktor Hilfsbedürftigkeit recht scharf, den Risikofaktor Immobilität näherungsweise ab. Die Pflegestufe positiv getesteter Bewohner wird daher unter dem Gliederungspunkt Risikofaktoren aufgeführt. Es zeigte sich folgende Verteilung:

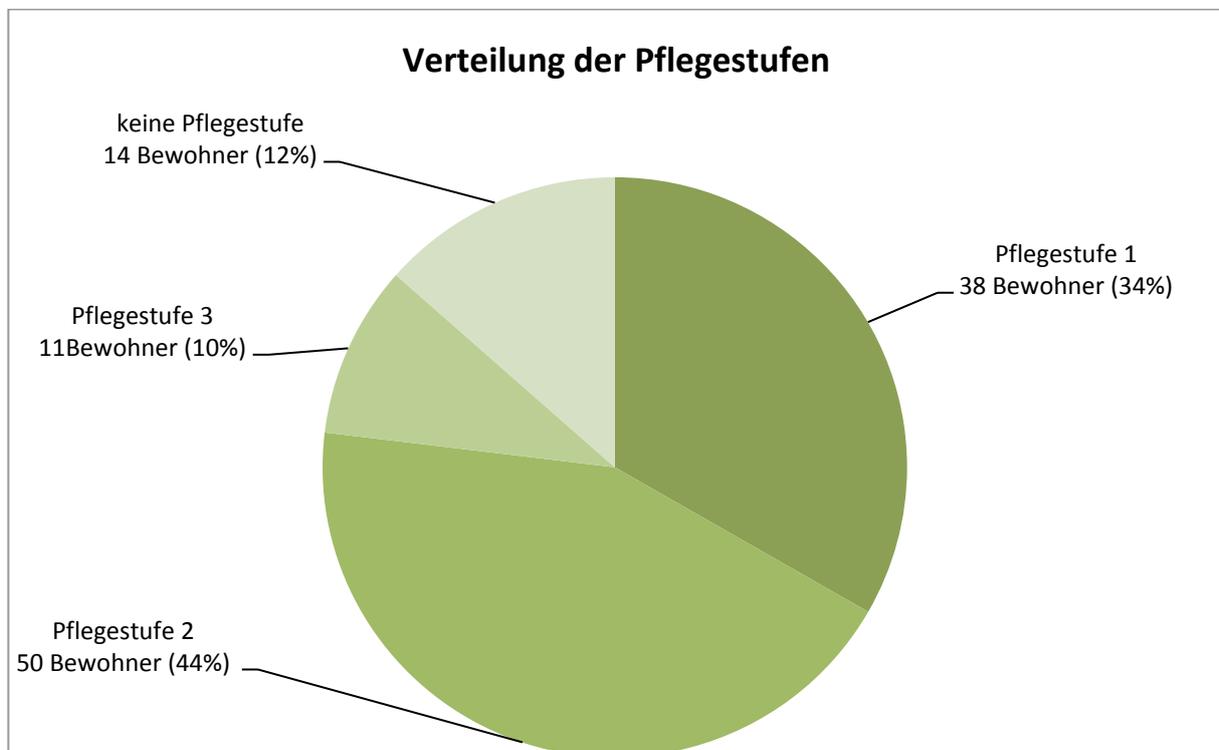


Abbildung 9: Verteilung der Pflegestufen positiv getesteter Bewohner

Insgesamt hatten 99 der 113 positiv getesteten Bewohner eine Pflegestufe, was einem prozentualen Anteil von 88% entspricht.

Trotz der dargestellten engen Assoziation der Pflegestufe zu beschriebenen Risikofaktoren zeigte die Auswertung der in dieser Studie gewonnenen Daten mittels einfaktorieller Varianzanalyse im Hinblick auf die Pflegestufe der Bewohner keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die drei nach Prävalenz geordneten Heimgruppen:

$F(2,110) = 1,408$ ,  $p = 0,249$ . Die gewonnenen Daten geben mithin keinen Anhalt für die Einordnung der Heimaufenthaltsdauer als Risikofaktor einer MRSA-Besiedelung.

Pfingsten-Würzburg et al haben die Pflegestufe als eigenständigen Risikofaktor herausgearbeitet.<sup>179</sup> In einigen europäischen Untersuchungen sind bei Heimbewohnern geriatrische Scores erhoben worden, die wesentlich an der Hilfsbedürftigkeit orientiert sind und daher zu einem Vergleich mit den in dieser Studie zur Pflegestufe erfassten Daten sinnvoll herangezogen werden können. Eveillard et al konnten mit dem französischen AGGIR-Score eine signifikante Risikoerhöhung nachweisen,<sup>184</sup> Jans et al mit dem Katz-Score ebenfalls.<sup>239</sup> Mit dem Barthel-Index ließ sich von Manzur et al ein solcher Zusammenhang nicht nachweisen.<sup>190</sup> Die Studienlage ist demnach auch zu diesem Punkt uneinheitlich.

#### **4.4.6 Weitere Risikofaktoren**

Bei MRSA-positiv getesteten Bewohnern wurden weitere Daten bezüglich des Vorliegens bestimmter, mit einer Gesundheitsstörung assoziierter Faktoren erfasst, die in der Literatur bereits als Risikofaktoren einer MRSA-Besiedelung beschrieben wurden. In dem folgenden Diagramm werden die gewonnenen Daten abgebildet.

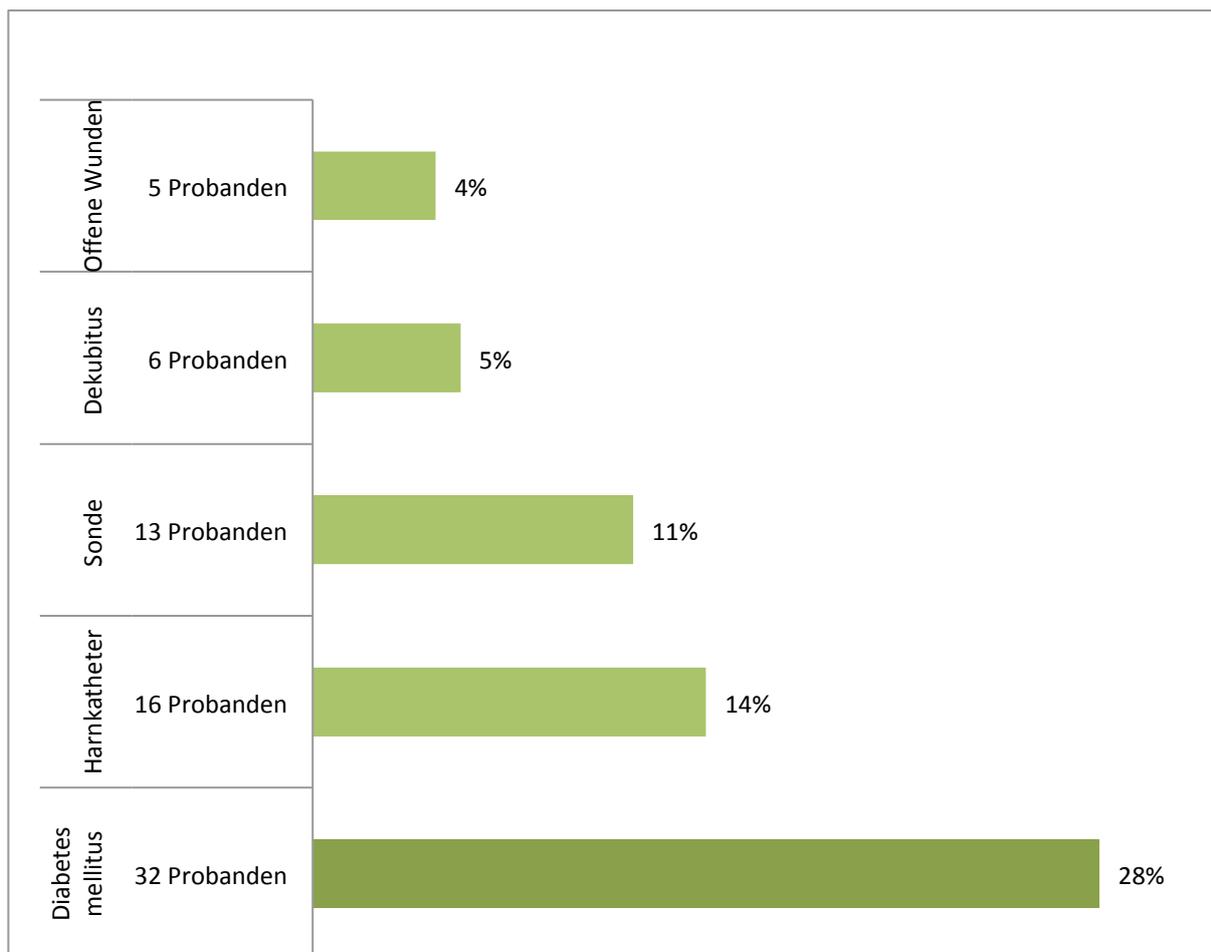


Abbildung 10: Häufigkeiten einzelner bekannter Risikofaktoren bei MRSA-positiv getesteten Bewohnern

Auch die in Abbildung 10 genannten Risikofaktoren wurden auf statistisch signifikante Zusammenhänge zu den Heim-Prävalenzgruppen überprüft.

#### 4.4.6.1 Diabetes mellitus

Eine Diabetes mellitus-Erkrankung zeigte in der Testung mittels Kontingenztafel und Chi-Quadrat-Test keinen signifikanten Zusammenhang zu den MRSA-Prävalenzgruppen:  $X^2(2) = 1,766$ ,  $p = 0,413$ .

#### 4.4.6.2 Sonden und Katheter

Das Merkmal „Liegen von Harnkathetern und Gastrostomiesonden“ stand gemäß der Analyse der Kontingenztafeln in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang zu den MRSA-Prävalenzgruppen.

#### 4.4.6.3 Offene Wunden und Geschwüre

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Wunden oder Decubitalgeschwüren und den MRSA-Prävalenzgruppen ergab sich auch bei Betrachtung der Kontingenztafeln nicht.

#### 4.4.7 Größe der Heimeinrichtung

Die Heimgröße ist als Risikofaktor beschrieben<sup>190</sup> und wurde daher in der vorliegenden Arbeit erfasst. Eine grafische Übersicht über die Zusammenhänge zwischen Heimgröße und MRSA-Prävalenzen gibt die folgende Abbildung.

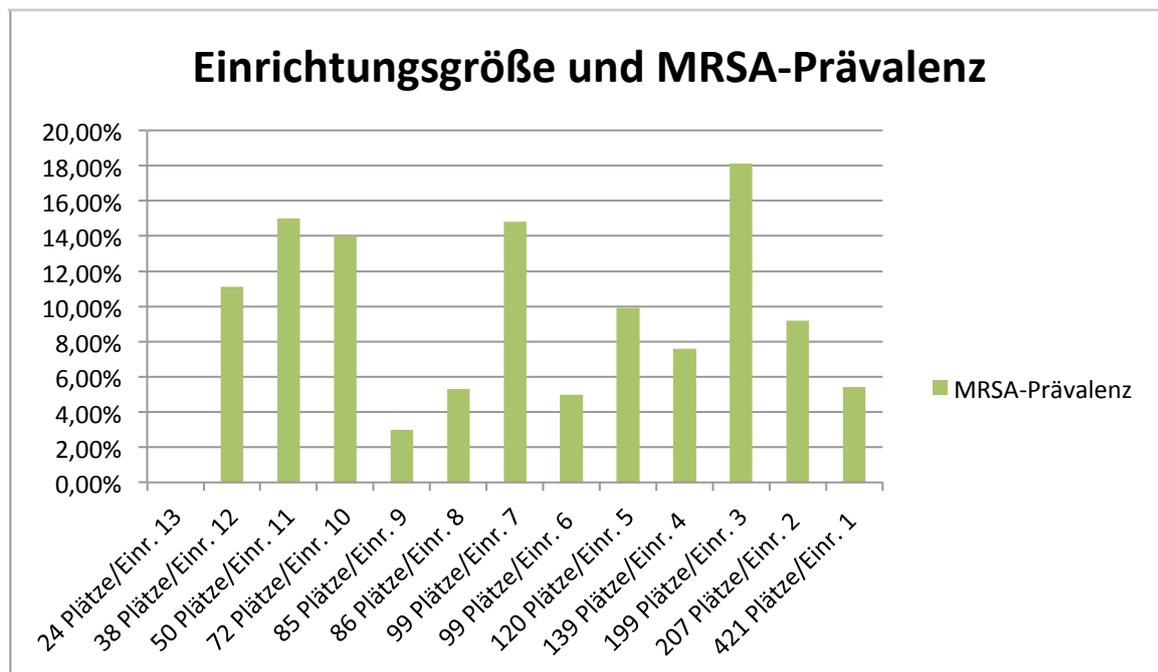


Abbildung 11: X-Achse: Anzahl der Heimplätze der untersuchten Einrichtungen, Y-Achse: MRSA-Prävalenz in den einzelnen Heimen.

Um eine statistische Auswertung der Daten zu ermöglichen, wurden die Einrichtungen in zwei Gruppen aufgeteilt: Eine Gruppe mit weniger als 120 und eine Gruppe mit 120 oder mehr Bewohnern. Bei der statistischen Auswertung der Daten mittels Kontingenztafel und Chi-Quadrat-Test ergab sich ein statistischer Zusammenhang zwischen einer Heimgröße von bis zu 120 und der Zuordnung zu der Heimgruppe mit hoher MRSA-Prävalenz:  $X^2(2) = 16,556$ ,  $p = 0,000$ .

#### 4.4.8 Fälle bekannter MRSA-Besiedelung

Teilnehmende Einrichtungen wurden vor der Probenentnahme um Auskunft bezüglich aktueller MRSA-Besiedelungsfälle gebeten, wobei „aktuelle Besiedelung“ definiert war als bekannte MRSA-Besiedelungen innerhalb der letzten sechs Monate, bei denen kein dreimalig negatives Abstrichergebnis vorliegt. Die angegebene Anzahl bekannter Besiedelungen in den unterschiedlichen Einrichtungen schwankte zwischen null und 20 Bewohnern, insgesamt wurden 38 Fälle bekannter MRSA-Besiedelung angegeben. Zwei Einrichtungen konnten in Ermangelung einer zentralen Erfassung MRSA-besiedelter Bewohner lediglich Auskunft geben, dass Besiedelungen bekannt sind, nicht jedoch wie viele Bewohner betroffen sind.

**Tabelle 16: Anzahl der zum Zeitpunkt des Screenings bekannten MRSA-Besiedelungen und deren Relation zur Anzahl der im Screening nachgewiesenen MRSA-Fälle. Die Anordnung der Heime erfolgte absteigend nach der im Screening nachgewiesenen MRSA-Prävalenz**

Heimeinrichtung	Anzahl bekannter MRSA-Besiedelungen	MRSA-positiv getestete Bewohner
Einrichtung 3	20	20
Einrichtung 11	keine Daten	7
Einrichtung 7	0	8
Einrichtung 10	2	9
Einrichtung 12	0	4
Einrichtung 5	2	9
Einrichtung 2	9	16
Einrichtung 4	4	8
Einrichtung 9	keine Daten	22
Einrichtung 8	1	4
Einrichtung 6	0	5
Einrichtung 9	0	2
Einrichtung 13	0	0
Summe	38	114

Die Zuordnung bekannter Besiedelungsfälle zu einzelnen Probanden wurde dadurch erschwert, dass teilweise, unter Verweis auf die Verschwiegenheitspflicht, die von den Einrichtungen gemachten Angaben zu bekannten MRSA-Besiedelungsfällen nur in nicht personalisierter Form gemacht wurden. Unter den 114 in dieser Studie nachgewiesenen MRSA-Besiedelungen konnten 17 als in den Einrichtungen bekannte MRSA-Fälle identifiziert werden. Von diesen 17 bekannten Besiedelungsfällen waren 15 Bewohner der Heimeinrichtung mit der Identifikationsnummer 3, jeweils ein bekannter MRSA-Besiedelungsfall konnte den Heimen mit den Nummern 2 und 10 zugeordnet werden. Die

verglichen mit der tatsächlichen Anzahl besiedelter Bewohner niedrige Rate der den Heimen im Voraus bekannten Besiedelungen ist Ausdruck und Ergebnis fehlender oder unzureichender Surveillancestrategien in den Heimen. Aufgrund der unvollständigen Datenlage war eine weitergehende statistische Auswertung nicht sinnvoll.

#### 4.5 Phänotypisierung mittels Agardiffusionstest und Antibiogramm

Alle 114 MRSA-positiven Isolate wurden mittels eines Agardiffusionstests untersucht. Es zeigten sich fünf verschiedene Antibiotogramme. Um in den folgenden Ausführungen auf umständliche Umschreibungen verzichten zu können, wurde jedem Resistenzphänotyp ein Identifikationsbuchstabe zugeordnet.

**Tabelle 17: Darstellung der unterschiedlichen Resistenzphänotypen nach Häufigkeit ihres Auftretens**

ID-Buchstabe	Häufigkeit	SAM	CIP	CC	E	D	GM	LVX	OX	P	SXT	TEC	VA
<b>α</b>	82	R	R	R	R	E	E	R	R	R	E	E	E
<b>β</b>	13	R	R	E	R	E	E	R	R	R	E	E	E
<b>γ</b>	5	R	R	E	E	E	E	R	R	R	E	E	E
<b>δ</b>	3	R	R	R	E	E	E	R	R	R	E	E	E
<b>ε</b>	8	R	R	R	R	E	E	E	R	R	E	E	E
<b>ζ</b>	1	R	R	R	R	E	R	R	R	R	E	E	E
<b>η</b>	1	R	R	E	R	E	E	R	R	R	R	E	E
<b>θ</b>	1	R	R	R-E	R	E	E	E	R	R	E	E	E

SAM: Ampicillin/Sulbactam, CIP: Ciprofloxacin, CC: Clindamycin; E: Erythromycin, D: Doxycyclin, GM: Gentamicin, LVX: Levofloxacin, OX: Oxacillin, P: Penicillin, SXT: Sulfamethoxazol-Trimethoprim, TEC: Teicoplanin, VA: Vancomycin.

Resistenzphänotypen von *Staphylococcus aureus* lassen sich aufgrund des charakteristischen Resistenzmusters oftmals bestimmten, auch genotypisch charakterisierbaren Epidemiestämmen zuordnen.<sup>240</sup> Die in dieser Studie nachgewiesenen Resistenzmuster entsprechen zu 78,9% (90 Isolate) dem Resistenzprofil des Rhein-Hessen-Phänotyps. Isolate dieser Zuordnung unterschieden sich untereinander noch in ihrer Empfindlichkeit gegen Levofloxacin (LVX): 82 waren gegen LVX resistent, acht Isolate reagierten empfindlich. Ein Isolat zeigte das Resistenzmuster des Süddeutschen Phänotyps mit einer zusätzlichen Resistenz gegen Gentamicin. Insgesamt ließen sich demnach 91 Isolate (79,8%) nach ihrem Phänotyp einem regionalen Phänotyp zuordnen. Die übrigen, nicht eindeutig zuzuordnenden Isolate ähnelten in ihrem Resistenzprofil sehr dem Profil des Rhein-Hessen-Typs,

unterschieden sich von diesem aber durch ihre Empfindlichkeit gegenüber Clindamicin (13 Isolate) Erythromicin (3 Isolate) beziehungsweise gegen beide Chemotherapeutika (5 Isolate). Ein Isolat zeigte eine intermediäre Resistenz gegen Clindamicin, entsprach im Übrigen dem Muster des Rhein-Hessen Phänotyps. Eine Übersicht über die phänotypische Zuordnung gibt die folgende Abbildung:

**Tabelle 18: Zuordnung des Resistenzphänotyps zu bekannten Phänotypen**

Identifikationsbuchstabe	Epidemiestamm	Prozentuale Häufigkeit
<b>α</b>	Rhein-Hessen Phänotyp	71,93%
<b>β</b>	nicht zuzuordnen	11,4%
<b>γ</b>	nicht zuzuordnen	4,38%
<b>δ</b>	nicht zuzuordnen	2,63%
<b>ε</b>	Rhein-Hessen Phänotyp	7,01%
<b>ζ</b>	Süddeutscher Phänotyp	0,87%
<b>η</b>	nicht zuzuordnen	0,87%
<b>θ</b>	nicht zuzuordnen	0,87%

Betrachtet man die Resistenzlage bei den einzelnen getesteten Antibiotika, zeigt sich, dass alle isolierten MRSA eine Resistenz gegen folgende Wirkstoffe zeigten:

- Ampicillin/Sulbactam
- Ciprofloxacin
- Oxacillin
- Penicillin

Bei den folgenden Antibiotika war jeweils der angegebene Anteil der Isolate resistent:

- Levofloxacin      105 von 114    (92,1%)
- Erythromicin     106 von 114    (92,9%)
- Clindamycin      96 von 114    (84,2%) exklusive eines intermediär resistenten  
Isolates
- Gentamicin        1 von 114      (0,87%)

Ein Isolat zeigte eine intermediäre Resistenz gegenüber Clindamycin

Durchgehend empfindlich reagierten die Isolate auf folgende Antibiotika:

- Doxycyclin
- Cotrimoxazol
- Teicoplanin
- Vancomycin

Die nachgewiesenen Resistenzprofile entsprechen verbreiteten Resistenzmustern von in Deutschland isolierten MRSA, wie ein Vergleich mit vom Robert Koch Institut veröffentlichten Daten zu MRSA-Resistenzprofilen bei Krankenhausinfektionen zeigt<sup>82</sup> (siehe Tabelle 3). Vancomycin-intermediär-empfindliche *S. aureus* (VISA) oder Vancomycin-resistente *S. aureus* (VRSA) wurden nicht detektiert.

## 4.6 Molekularbiologische Typisierung

Die molekularbiologischen Verfahren fanden Anwendung, um einen Vergleich mit bereits erhobenen epidemiologischen Daten beziehungsweise den Ergebnissen zukünftiger Untersuchungen zu ermöglichen, und um im Rahmen dieser Studie gegebenenfalls MRSA-Verbreitungswege in Alten- und Pflegeeinrichtungen sowie zwischen diesen und Krankenhäusern aufzuzeigen, und so potenzielle Cluster zu erkennen.

Auf Grundlage der sich im Agardiffusionstest zeigenden Resistenzprofile wurde, bezüglich jeder Heimeinrichtung, zwischen einem vorherrschenden, die Mehrzahl der Isolate umfassenden Resistenzmuster, und aberranten Mustern differenziert. Die *spa*-Typisierung wurde bei ein bis vier Isolaten mit vorherrschenden und allen Isolaten mit abweichenden Mustern durchgeführt. Insgesamt wurden bei einer Gesamtzahl von 114 MRSA-positiven Isolaten 46 Isolate *spa*-typisiert. Die resultierenden *spa*-Typen dienten wiederum als Grundlage zur Auswahl der Isolate, die einer Pulsfeldgelelektrophorese unterzogen wurden. Von jedem *spa*-Typ wurde mindestens ein Isolat mittels Elektrophorese untersucht. Insgesamt wurden 33 Isolate einer Gelelektrophorese unterzogen.

### 4.6.1 *spa*-Typisierung

Von den 46 typisierten Isolaten lassen sich 45 bekannten *spa*-Typen zuordnen. Es wurden vierzehn verschiedene *spa*-Typen nachgewiesen. Ein Isolat ließ sich aufgrund einer unzureichenden Qualität der Sequenz (Repeat: 26-17-20-17-12-17-xAA-16) nicht sicher zuordnen, dem Isolat wurde die Bezeichnung txAI zugewiesen.

21 der Isolate (45,6%) wurden als dem *spa*-Typ t003 zugehörig identifiziert. Die entsprechenden Sequenzientypen nach MLST sind ST-5 und ST-225. Isolate dieses Typs werden dem klonalen Komplex 5 (CC5) zugeordnet. Es handelt sich bei t003 um einen epidemischen MRSA, der nach Endemiegebieten als Rhine Hesse MRSA (subclone), New York clone oder EMRSA-3 bezeichnet wird.

Sieben Isolate (15,2%) gehörten dem *spa*-Typ t504 an, der ebenfalls dem CC5 zugerechnet wird. Jeweils drei Isolate (6,2%) wurden als *spa*-Typ t2379 beziehungsweise t1007 identifiziert. Zwei Isolate konnten dem *spa*-Typ t837 zugerechnet werden.

Weitere nachgewiesene *spa*-Typen traten solitär auf und sind in der folgenden Tabelle mit aufgelistet. Die Ergebnisliste der *spa*-Typisierung findet sich im Anhang der Arbeit.

**Tabelle 19: Nachgewiesene *spa*-Typen nach Häufigkeit ihres Auftretens**

<i>spa</i> -Typ	Repeatfolge	<i>spa</i> -Typ MLST	Kommentar	Häufigkeit (%)
t003	26-17-20-17-12- 17-17-16	ST-5, ST-225	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	21 (45,65%)
t504	26-17-20-17-12			7 (15,22%)
t2379	26-17			3 (6,52%)
t1007	26-17-20-17			3 (6,52%)
t837	26-17-20-17-12- 17			2 (4,35%)
t7333	26-17-20			1 (2,17%)
txAI	26-17-20-17-12- 17-xAA-16			1 (2,17%)
t001	26-30-17-34-17- 20-17-12-17-16	ST-5, ST-222, ST-228	CC5, Southern German MRSA (prototype & subclone), Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA- 3, New York clone	1 (2,17%)
t002	26-23-17-34-17- 20-17-12-17-16	ST-5, ST-231	CC5, Rhine Hesse MRSA (prototype), EMRSA-3, New York clone, Japan clone, Pediatric	1 (2,17%)

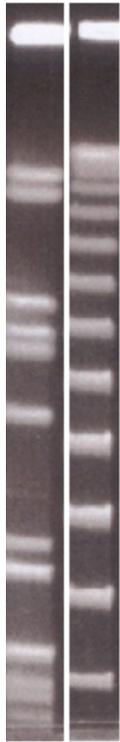
<i>spa</i> -Typ	Repeatfolge	<i>spa</i> -Typ MLST	Kommentar	Häufigkeit (%)
t1340	26-23-17-34-17- 20-17			1 (2,17%)
t105	26-23-17-34-17- 20-17-17-16	ST-5		1 (2,17%)
t067	26-23-17-34-17- 20-17-12-17			1 (2,17%)
t2235	26-23			1 (2,17%)
t458	26			1 (2,17%)
t918	09-02			1 (2,17%)

Die Häufigkeitsverteilung der *spa*-Typen entspricht den Erwartungen. Die beiden häufigsten *spa*-Typen t003 und t504 waren die zum Erhebungszeitpunkt in klinischen Isolaten im Saarland überwiegend anzutreffenden *spa*-Typen.<sup>241</sup>

#### 4.6.2 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Ergebnisse der PFGE sollten mit denen der *spa*-Typisierung verglichen werden um festzustellen, ob und inwieweit sich die Ergebnisse hinsichtlich Diskriminationsgrad und Zuordnung zu den bekannten Epidemiestämmen unterschieden. Es wurden insgesamt 33 Isolate einer PFGE unterzogen. Epidemische MRSA zeigen in der PFGE ein für den jeweiligen Stamm charakteristisches Bandenmuster und können anhand dieses Musters epidemiologisch eingeordnet werden. Im Folgenden Abschnitt werden die aufgetretenen Laufmuster bekannten Epidemiestämmen zugeordnet dargestellt. Zudem werden die für die Isolate mit den entsprechenden Bandenmustern ermittelten *spa*-Typen angegeben. Die Originalfotografien der PFGE-Laufmuster finden sich im Anhang der Arbeit.

#### 4.6.2.1 Dem Rhein-Hessen-Epidemiestamm zugeordnete Bandenmuster und die entsprechenden *spa*-Typen



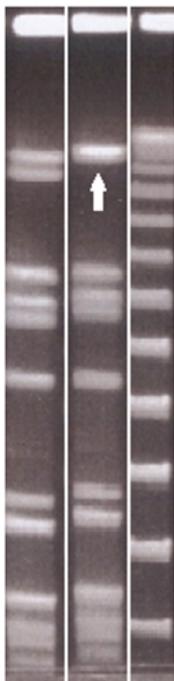
A PFGE-Marker

31 der untersuchten Isolate ließen sich dem Rhein-Hessen-Epidemiestamm zuordnen. Innerhalb der Gruppe „Rhein-Hessen-Stamm“ wurden maximal vier Fragmentunterschiede bezogen auf das charakteristische Bandenmuster akzeptiert.

Das mit A gekennzeichnete Bandenmuster war insgesamt neun Mal und damit am Häufigsten zu sehen. Es zeigt das für den Rhein-Hessen-Epidemiestamm charakteristische Muster (Rhein-Hessen-Prototyp). Isolate dieses Bandenmusters wurden in der *spa*-Typisierung wie folgt klassifiziert:

<i>spa</i> -Typ	t003	t504	t002	t2235	t2379	∞	<i>spa</i> -Typisierung
<b>Häufigkeit</b>	3	2	1	1	1	1	

Abbildung 12: Bandenmuster A des Rhein-Hessen-Epidemiestammes



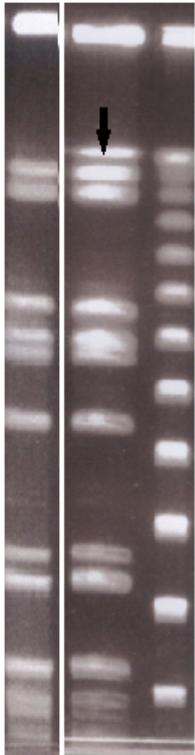
A a PFGE-Marker

Das mit a bezeichnete Bandenmuster fand sich bei sechs Isolaten. Im Vergleich zum Rhein-Hessen-Prototyp fällt eine fehlende Bande auf.

Hinsichtlich der *spa*-Typen ergab sich folgende Verteilung:

<i>spa</i> -Typ	t003	t2379	t504	t1007
<b>Häufigkeit</b>	2	2	1	1

Abbildung 13: Bandenmuster a. Weiße Pfeile=im Vergleich zum R.H.-Prototyp fehlende Bande. Schwarze Pfeile=im Vergleich zum R.H.-Prototyp zusätzliche Bande

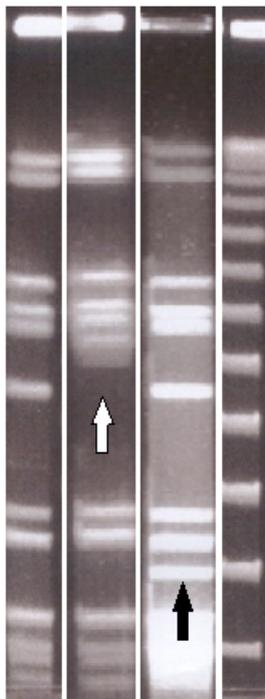


A b PFGE -  
Marker

b wurde als Bandenmuster zweimal nachgewiesen und zeigt im Vergleich zum R.-H.-Prototyp eine zusätzliche Bande. Die *spa*-Typisierung zeigte folgendes Bild:

<b><i>spa</i>-Typ</b>	t003	txAI
<b>Häufigkeit</b>	1	1

Abbildung 14: Bandenmuster b. Weiße Pfeile=im Vergleich zum R.H.-Prototyp fehlende Bande. Schwarzer Pfeil=im Vergleich zum R.H.-Prototyp zusätzliche Bande

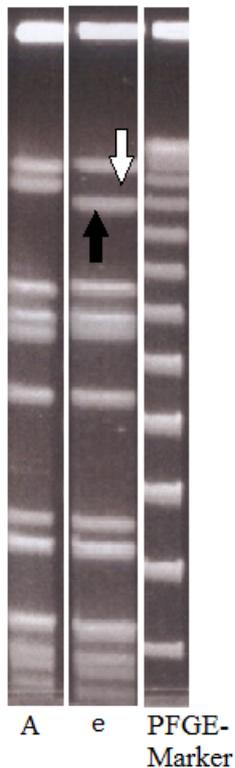


A c d PFGE-  
Marke

Die abgebildeten Bandenmuster c und d unterscheiden sich durch jeweils einen Fragmentunterschied vom Rhein-Hessen-Prototyp. Die *spa*-Typisierung der entsprechenden Isolate erbrachte folgende Ergebnisse:

<b>Isolat</b>	<b>c</b>	<b>d</b>
<b><i>spa</i>-Typ</b>	<b>t837</b>	<b>t504</b>

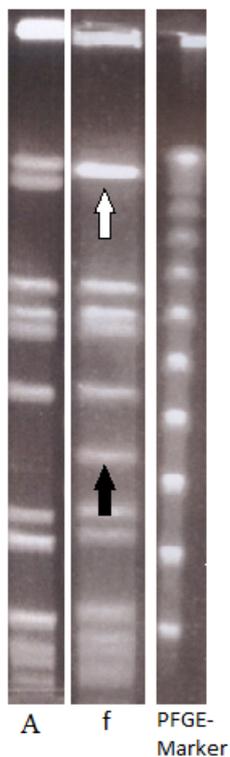
Abbildung 15: Bandenmuster c und d. Weiße Pfeile=im Vergleich zum R.H.-Prototyp fehlende Bande. Schwarzer Pfeil=im Vergleich zum R.H.-Prototyp zusätzliche Bande



Bandenmuster e wurde zweimal nachgewiesen und zeigt gegenüber dem Rhein-Hessen-Stamm zwei Fragmentunterschiede. Isolate dieses Bandenmusters hatten folgende *spa*-Typen:

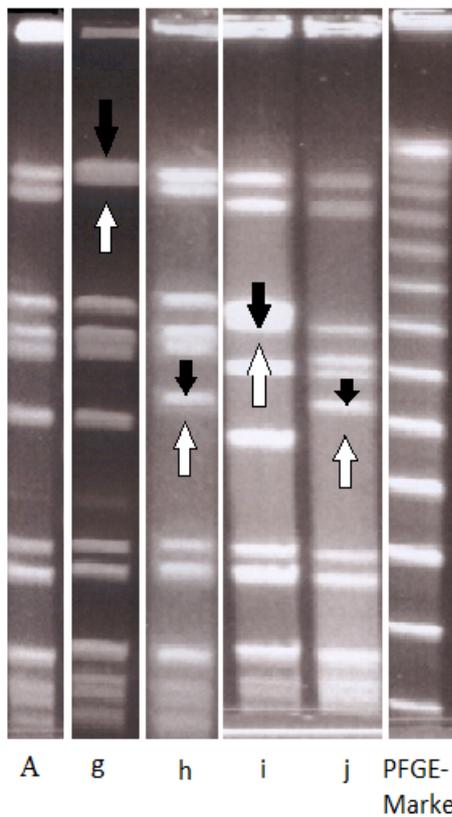
<i>spa</i> -Typ	t003	t458
Häufigkeit	1	1

Abbildung 16: Bandenmuster e. Weiße Pfeile=im Vergleich zum R.H.-Prototyp fehlende Bande. Schwarzer Pfeil=im Vergleich zum R.H.-Prototyp zusätzliche Bande



Das zweimal nachgewiesene Bandenmuster f ist durch zwei Bandenunterschiede gekennzeichnet, die entsprechenden Isolate hatten den *spa*-Typ **t003**.

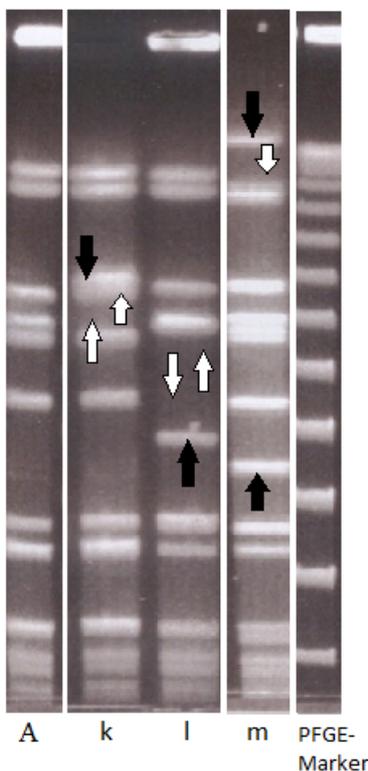
Abbildung 17: Bandenmuster f. Weiße Pfeile=im Vergleich zum R.H.-Prototyp fehlende Bande. Schwarzer Pfeil=im Vergleich zum R.H.-Prototyp zusätzliche Bande



Die abgebildeten Bandenmuster g-j mit jeweils zwei unterschiedlichen Banden wurden jeweils einmal nachgewiesen. Die Isolate wiesen folgende *spa*-Typen auf:

Isolat	g	h	i	j
<i>spa</i> -Typ	t837	t003	t003	t7333

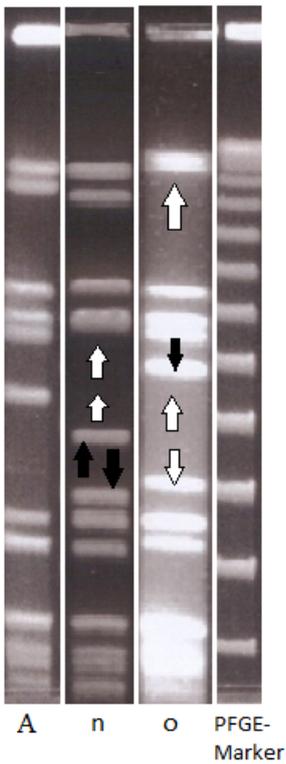
Abbildung 18: Bandenmuster g,h,i,j. Weiße Pfeile=im Vergleich zum R.H.-Prototyp fehlende Bande. Schwarzer Pfeil=im Vergleich zum R.H.-Prototyp zusätzliche Bande



Die Muster k-m mit drei Fragmentunterschieden traten jeweils einmal auf, und die korrespondierenden Isolate wurden wie folgt *spa*-klassifiziert:

Isolat	k	l	m
<i>spa</i> -Typ	t067	t1340	t003

Abbildung 19: Bandenmuster k,l,m. Weiße Pfeile=im Vergleich zum R.H.-Prototyp fehlende Bande. Schwarzer Pfeil=im Vergleich zum R.H.-Prototyp zusätzliche Bande

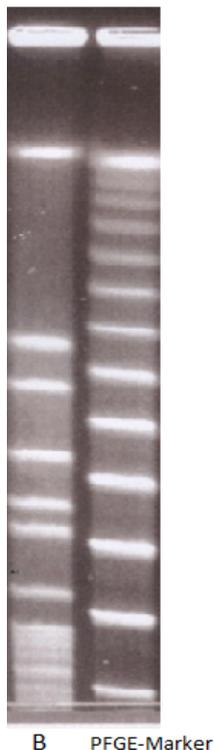


Die Bandenmuster n und o wiesen vier vom Rhein-Hessen-Prototyp abweichenden Banden auf. Trotzdem sind sie deutlich als dem R.-H.-Stamm verwandte Isolate zu erkennen. In der *spa*-Typisierung wurden die entsprechenden Isolate folgendermaßen eingeordnet:

Isolat	n	o
<i>spa</i> -Typ	t105	t003

Abbildung 20: Bandenmuster n, o. Weiße Pfeile=im Vergleich zum R.H.-Prototyp fehlende Bande. Schwarzer Pfeil=im Vergleich zum R.H.-Prototyp zusätzliche Bande

#### 4.6.2.2 Dem Barnimer Epidemiestamm zugeordnete Bandenmuster und die entsprechenden *spa*-Typen



Zwei Isolate zeigten das typische Bandenmuster des Barnimer Epidemiestammes. Aufgrund eines technischen Fehlers ist lediglich eines der Isolate mit diesem Bandenmuster *spa*-typisiert worden. Es wurde der *spa*-Typ t918 nachgewiesen.

Abbildung 21: Bandenmuster des Barnimer Epidemiestammes

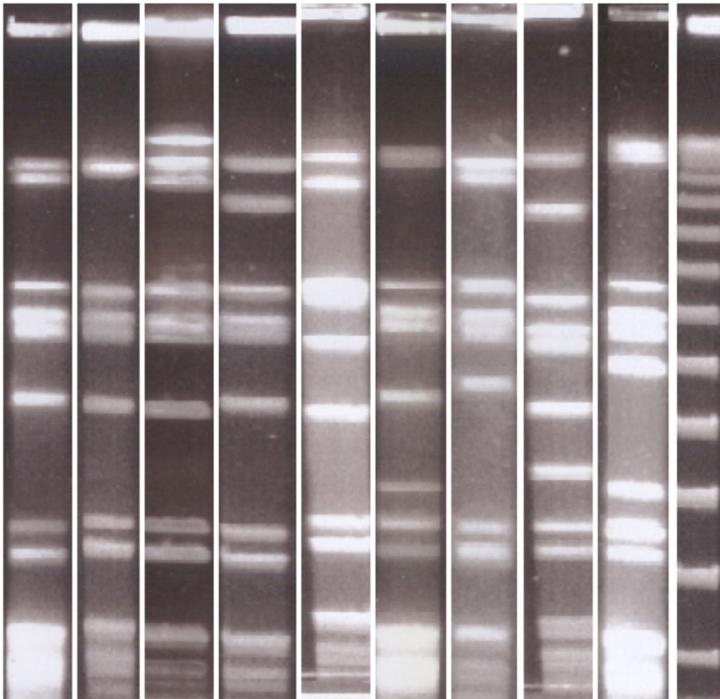
### 4.6.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse von Pulsfeldgelelektrophorese, *spa*-Typisierung und Phänotypisierung nach Antibiogramm

Wie beschrieben wurden 46 Isolate *spa*-typisiert, 33 der *spa*-sequenzierten Isolate wurden zudem einer PFGE unterzogen. Die 33 einer PFGE unterzogenen Isolate gehörten acht verschiedene *spa*-Typen an, in der PFGE zeigten sich 17 unterschiedliche Laufmuster. Dieses Ergebnis unterstreicht die in der Literatur durchgängig beschriebene höhere diskriminative Fähigkeit der PFGE<sup>242, 243</sup> im Vergleich zur Typisierung nach *spa* oder MLST.

Bei den *spa*-Typen t003, t504, t2379 ließen sich innerhalb eines Typs bis zu vier abweichende Banden in der PFGE finden. Die beiden ebenfalls mehrfach nachgewiesenen *spa*-Typen t1007 und t837 zeigten in der PFGE identische Laufmuster. Es folgen Abbildungen, in denen die PFGE-Laufmuster der am häufigsten nachgewiesenen *spa*-Typen dargestellt sind.

Von den insgesamt nachgewiesenen 21 Isolaten mit dem *spa*-Typ **t003** wurde bei 13 Isolaten eine PFGE vorgenommen. Es zeigten sich die in Abbildung 23 dargestellten Laufmuster. Dabei trat Laufmuster A dreimal, Laufmuster a und f jeweils zweimal auf, die restlichen Muster konnten jeweils einmal nachgewiesen werden.

PFGE-  
Nummern:  
20 5 33 6 10 21 31 9 18 PFGE-  
Marker

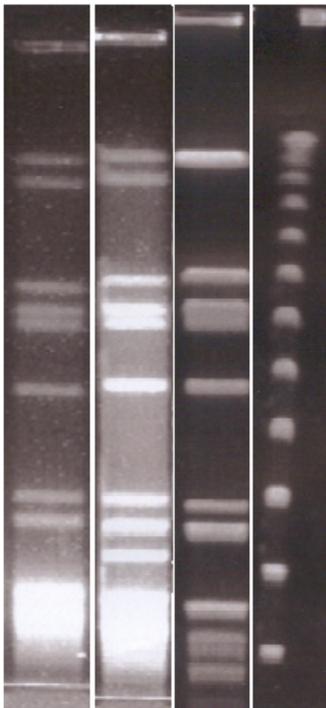


Identifikationsbuchstabe des Bandenmusters:

A a b e i f h m o

Abbildung 22: spa-Typ t003 und entsprechende PFGE

PFGE-  
Nummer:  
16 13 23 PFGE-  
Marker



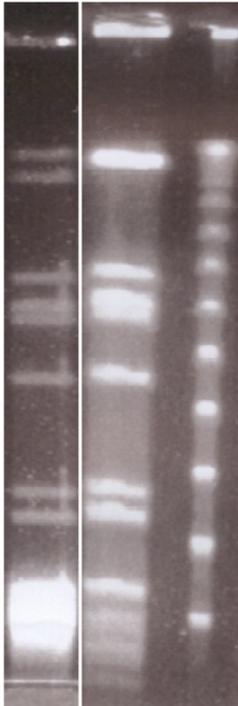
Identifikationsbuchstabe des  
Bandenmusters:

A d a

Von dem sieben Mal aufgetretenen spa-Typ t504 wurden vier Isolate mittels PFGE untersucht. Dabei traten das Resistenzmuster A zweimal und die Muster a und d jeweils einmal auf.

Abbildung. 23: spa-Typ t504 und entspr. PFGE

PFGE  
 Nummern: PFGE-  
 14 23 Marker



Identifikationsbuchstaben  
 der Bandenmuster:

A a

spa-Typ **t2379** trat dreimal auf, alle Isolate wurden mittels PFGE untersucht. Bandenmuster a trat zweimal, Bandenmuster A einmal auf.

Abb. 24: spa-Typ t2379 und entspr. PFGE

Beim Vergleich der molekularen mit der phänotypischen Typisierung nach Antibiogramm zeigt sich die geringere epidemiologische Trennschärfe der phänotypischen Typisierung im Vergleich zu der nach *spa*. So ließen sich bei den 23 Isolaten des Resistenzphänotyps **α**, die *spa*-typisiert worden sind, neun verschiedene *spa*-Typen nachweisen. Isolate des Resistenzphänotyps **β** wiesen sieben unterschiedliche *spa*-Typen auf, und die drei *spa*-typisierten Isolate des dritthäufigsten Resistenzphänotyps **ε** wiesen drei verschiedene *spa*-Typen auf. Auffällig war die Häufung des *spa*-Typs t003 in der Resistenzgruppe **α**, im Übrigen ließen sich keine besonderen Verteilungsschwerpunkte erkennen. Die folgende Abbildung gibt die bei den jeweiligen Resistenzphänotypen nachgewiesenen *spa*-Typen wieder und illustriert den geringen Diskriminationsgrad der phänotypischen Typisierung.

**Tabelle 20: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Typisierung nach Antibiogramm und *spa***

Identifikationsbuchstabe des Resistenzphänotyps	Nachgewiesene <i>spa</i> -Typen
<b>α</b>	t003, t504, t2379, t1007, txAI, t7333, t001, t067, t458
<b>β</b>	t003, t504, t2379, t837, t002, t2235, t918
<b>γ</b>	∞
<b>δ</b>	t003, t1007
<b>ε</b>	t2379, t1007, t837
<b>ζ</b>	t504
<b>η</b>	t003
<b>θ</b>	∞

∞: es wurde kein Isolat des Resistenzphänotyps *spa*-typisiert

#### 4.6.4 Typisierungsergebnisse, den einzelnen Heimen zugeordnet

Eine Zuordnung der molekularbiologischen Typisierungsergebnisse zu den Heimen ermöglicht Rückschlüsse auf MRSA-Übertragungswege.

Bei der Zuordnung der Ergebnisse der *spa*-Typisierung zeigten sich, je nach Einrichtung, zwischen einem und fünf *spa*-Typen, die Zuordnung der PFGE ergab ein bis sieben Typen. Auffälligstes Ergebnis ist, dass das Heim mit der höchsten MRSA-Prävalenz zugleich das einzige Heim ist, in dem bei identischen Antibiogrammen lediglich ein *spa*-Typ (t003) nachgewiesen wurde. Auch die beiden einer PFGE unterzogenen Isolate des Heims gehörten nach der Tenover-Klassifikation einem Typ an. Die Typisierungsergebnisse geben insoweit Anlass, das Vorliegen einer lokalen Epidemie in Erwägung zu ziehen.

#### 4.7 MRSA Besiedelung der Mitarbeiter teilnehmender Alten- und Pflegeeinrichtungen

Klinisch inapparente, nicht als MRSA-besiedelt erkannte Pflegekräfte stellen eine Schnittstelle in der Übertragung von MRSA dar<sup>244, 245</sup>. Die Feststellung der Prävalenz unter den Mitarbeitern war somit zur Klärung möglicher Übertragungswege innerhalb der einzelnen Einrichtungen von Bedeutung. Vor diesem Hintergrund wurde Mitarbeitern der teilnehmenden Einrichtungen die Untersuchung eines Nasenabstriches auf eine MRSA-Besiedelung angeboten. Teilnehmer aus zehn von dreizehn Heimeinrichtungen (61,5% der

Heime) nahmen am Screening teil, der Prozentsatz teilnehmender Mitarbeiter schwankte dabei von Heim zu Heim erheblich. Beispielsweise nahmen aus dem Einrichtung 2 mit 207 Plätzen 61 Mitarbeiter teil, aus der Einrichtung 3 mit 199 Plätzen nur 15 Mitarbeiter. Bei MRSA-positiv getesteten Mitarbeitern wurden anschließend Informationen über ihren Arbeitsbereich eingeholt.

**Tabelle 21: MRSA bei den Mitarbeitern der Alten- und Pflegeeinrichtungen, angeordnet in absteigender Prävalenz.**

Einrichtung	Mitarbeiter getestet	Mitarbeiter MRSA positiv	Prävalenz
Einrichtung 3	15	3	20%
Einrichtung 10	16	3	18,8%
Einrichtung 7	25	1	4%
Einrichtung 1	85	3	3,5%
Einrichtung 11	12	0	0%
Einrichtung 12	12	0	0%
Einrichtung 5	6	0	0%
Einrichtung 2	61	0	0%
Einrichtung 8	8	0	0%
Einrichtung 6	13	0	0%
Einrichtung 4	∞		
Einrichtung 9	∞		
Einrichtung 13	∞		
Summe/Mittelwert	253	10	4,2%

∞: Aus dem entsprechenden Heim hat sich kein Mitarbeiter untersuchen lassen

Anhand obiger Daten lässt eine gemittelte Prävalenz von 4,2% errechnen. Dabei schwankt die Prävalenz zwischen den einzelnen Heimen ganz erheblich. Alle positiv getesteten Mitarbeiter hatten im Rahmen ihrer pflegerischen Aufgabe direkten Kontakt zu positiv getesteten Heimbewohnern. Die tabellarische Gegenüberstellung der Besiedelungsrate von Bewohnern und Mitarbeitern der teilnehmenden Einrichtungen ergibt folgendes Bild:

**Tabelle 22: Gegenüberstellung der MRSA-Prävalenz der Bewohner und der Mitarbeiter der einzelnen Einrichtungen, angeordnet nach absteigender MRSA-Prävalenz der Bewohner.**

Einrichtung	MRSA-Prävalenz der Bewohner	MRSA-Prävalenz der Mitarbeiter
Einrichtung 3	18,1%	20%
Einrichtung 11	14,9	0%
Einrichtung 7	14,8%	4%
Einrichtung 10	14%	18,8%
Einrichtung 12	11,1%	0%
Einrichtung 5	9,9%	0%
Einrichtung 2	9,2%	0%
Einrichtung 4	7,6%	∞
Einrichtung 1	5,4	3,5%
Einrichtung 8	5,3%	0%
Einrichtung 6	5,3%	0%
Einrichtung 9	2 (2,9%)	∞
Einrichtung 13	0 (0%)	∞
Gemittelte Prävalenz	8,44%	4,2%

∞: Aus dem entsprechenden Heim hat sich kein Mitarbeiter untersuchen lassen.

## 5 Diskussion

*Staphylococcus aureus* ist einer der häufigsten und wichtigsten Erreger invasiver bakterieller Infektionen beim Menschen. Besonders als Erreger nosokomial erworbener Infektionen wie Pneumonien, Haut- und Wundinfektionen wird *S. aureus* sehr häufig identifiziert.<sup>246</sup> Ein großes infektionsepidemiologisches und hygienisches Problem stellt hierbei die in den letzten Jahren zunehmende Prävalenz Methicillin-resistenter *S. aureus*-Isolate dar. Infektionen durch diese häufig multiresistenten Keime sind schwierig zu therapieren und gehen mit einer im Vergleich zu Infektionen durch Methicillin-sensible Stämme erhöhten Mortalität einher.<sup>209</sup> Es sind national und international bereits eine Vielzahl von teilweise multizentrischen Prävalenzstudien zur Frage der MRSA-Besiedelung in Kliniken durchgeführt worden.<sup>247-249</sup>

### 5.1 Gesamtprävalenz

Die in dieser Untersuchung ermittelte MRSA-Gesamtprävalenz von 8,44% liegt im Vergleich mit den Ergebnissen von europa- und weltweit gelaufenen Screeninguntersuchungen in Alten- und Pflegeeinrichtungen im unteren Bereich (siehe Tabelle 7). Auf nationaler Ebene ergibt sich ein anderes Bild: In Studien aus den Jahren 1999 bis 2003 lag die Prävalenz in einem Bereich zwischen 0,26% und 2,4%<sup>175, 171, 174</sup>. Lediglich Höpken et al. konnten 2001 bei einer Untersuchung in einem Einzelheim eine MRSA-Prävalenz von 26% nachweisen.<sup>173</sup> Der ausgenommen hohe Wert der letztgenannten Studie resultiert aus Besonderheiten in diesem ländlich gelegenen, als Familienbetrieb geführten Heim und kann daher als Einzelfall gewertet werden. 2004 konnten Martin et al. einen deutlichen Anstieg auf eine Prävalenz von 9% feststellen.<sup>177</sup> In der vorliegenden Untersuchung, bei der die Probengewinnung 2006 erfolgte, zeigten sich ähnlich hohe Prävalenzen. Auch weitere Untersuchungen aus den Jahren 2009 und 2010 offenbarten steigende Prävalenzen. Popp et al. wiesen 2009 für sieben Einrichtungen in Thüringen eine Besiedelungsrate von 4,4% nach<sup>250</sup>, in sieben schleswig-holsteinischen Einrichtungen ließ sich in einer 2009/2010 erfolgten Untersuchung eine MRSA-Prävalenz von 5,8% feststellen<sup>251</sup>. Eine mit 7,6% deutlich höhere Prävalenz zeigte sich in einer 2010 in 32 Alten- und Pflegeeinrichtungen in Braunschweig vorgenommenen Untersuchung<sup>179</sup>. Nillius et al. stellten in einer 2016 veröffentlichten Prävalenzstudie in saarländischen Alten- und Pflegeeinrichtungen eine Prävalenzrate von 4,8 fest.<sup>180</sup> Es bleibt festzuhalten, dass in der vorliegenden Untersuchung mit 8,4% eine der bislang höchsten Prävalenzen in Alten- und Pflegeeinrichtungen in Deutschland nachgewiesen wurde.

Auffällig ist der starke Prävalenzanstieg zwischen den beiden im Saarland erfolgten Untersuchungen. In den 2003 beziehungsweise 2005 von Geipel et al. durchgeführten Untersuchung wurden lediglich Prävalenzen von 0,26% beziehungsweise 0,73% festgestellt<sup>175</sup>. Der Prävalenzanstieg folgt, wie oben beschrieben, einem nationalen Trend. Der steile Anstieg liegt jedoch über dem bei Betrachtung der Studienlage zu erwartenden Werten.

### **5.1.1 Prävalenzvergleich mit Prävalenzraten aus Krankenhäusern**

In Deutschland sind in bislang drei Studien MRSA-Punktprävalenzen stationärer Krankenhauspatienten ermittelt worden. Woltering et al. wiesen 2008 mittels stationärer, auf die Krankenhäuser des Kreises Hörter begrenzter Screeninguntersuchungen Punktprävalenzen von 3,4% nach.<sup>178</sup> In Essen hat sich 2008 ein MRSA-Netzwerk gebildet, welches unter Leitung des Gesundheitsamtes zweimal jährlich stationäre MRSA-Patienten erfasst. Ein zusätzliches Screening erfolgt dabei nicht, was die vergleichsweise geringen Prävalenzen zwischen 1,5% und 2,2%<sup>252</sup> in den Jahren 2009 bis 2012 begründet. Die mit 5,3% höchste Punktprävalenz ließ sich von Chaberny et al. 2005 in einer Universitätsklinik nachweisen.<sup>253</sup> In zwei weiteren Studien wurden Punktprävalenzen mittels eines MRSA-Aufnahmescreenings festgestellt. Die Aufnahmeuntersuchungen ergaben Prävalenzraten von 1,6%,<sup>254</sup> und 2,18%<sup>255</sup>.

Vergleicht man die in Heimeinrichtungen nachgewiesenen Punktprävalenzen (siehe Tabelle 7) mit diesen Krankenhausdaten, so fällt auf, dass die höchsten Prävalenzen seit mehreren Jahren nicht mehr in den Krankenhäusern, sondern in Heimeinrichtungen nachgewiesen wurden. Eine Übersicht gibt Tabelle 23.

**Tabelle 23: Vergleich der Punktprävalenzen bisheriger Studien in Heimeinrichtungen und Krankenhäusern in Deutschland**

Studienjahr	Punktprävalenz (%) in Alten- und Pflegeeinrichtungen	Punktprävalenz (%) in Krankenhäuser
1999 <sup>171, 172</sup>	2,2-2,4	∅
2001 <sup>173</sup>	21-26	∅
2002 <sup>174</sup>	3	∅
2003 <sup>175, 176</sup>	0-0,26	∅
2004 <sup>177</sup>	9	∅
2005 <sup>253</sup>	∅	5,3
2006	8,4	∅
2008 <sup>178</sup>		
2008 <sup>178</sup>	2,3	3,4
2009 <sup>252</sup>	∅	2,0
2011 <sup>179</sup>	7,6	∅
2016 <sup>180</sup>	4,8	

∅: Aus dem entsprechenden Jahr liegt keine MRSA-Punktprävalenzstudie vor.

Der zunehmende Anteil der Heimeinrichtungen am MRSA-Gesamtpool ist Ausdruck des immer besser werdenden MRSA-Managements mit stabilen Prävalenzen im klinischen Bereich und der im Vergleich dazu vernachlässigten MRSA-Surveillance mit steigenden, bzw. auf höherem Niveau stabilen Prävalenzen im Bereich von Alten- und Pflegeeinrichtungen. Ohne das Schließen dieser „Surveillance-Schere“ wird die MRSA-Problematik langfristig nicht zu lösen sein.

### 5.1.2 Prävalenzvergleich MSSA/MRSA-Raten.

Die gemittelte Prävalenz von MRSA an allen nachgewiesenen *Staphylococcus aureus*-Isolaten lag bei 20,1% und damit deutlich höher als in anderen Studien. Neuhaus et al. hatten 2001 eine Prävalenz von 6,3% ermittelt,<sup>174</sup> Woltering et al. 2008 eine Prävalenz von 2,3%<sup>178</sup>. Der für die saarländischen Heimeinrichtungen nachgewiesene Anteil an MRSA ist demnach außerordentlich hoch gewesen. Für einen Vergleich mit entsprechenden Krankenhausdaten können die Daten der PEG-Resistenzstudien herangezogen werden. Für das Jahr 2007 lag der Prozentsatz von MRSA an klinischen *Staphylococcus aureus*-Isolaten bei 20,3%,<sup>148</sup> und damit auf einem ähnlichen Niveau wie die Werte der vorliegenden Studie. Ein genauer Vergleich von Krankenhausprävalenzen ist allerdings nicht möglich, da im Krankenhaus nicht die

generellen *Staphylococcus aureus*-Besiedlungen, sondern in der Regel nur die *Staphylococcus aureus*- und MRSA-Infektionen nachgewiesen und erfasst werden.

Die Prävalenz von *Staphylococcus aureus* liegt bei gemittelten 43%, und damit in dem für geriatrische Heimbewohner mit altersentsprechenden Komorbiditäten zu erwartenden Bereich.<sup>7</sup> Betrachtet man einzelne Heime, fallen die teilweise sehr hohen Prävalenzen von bis zu 70% auf. Heime mit einer hohen Prävalenz von *Staphylococcus aureus* von über 50% wiesen dabei auch eine hohe Prävalenz an MRSA auf. Hinsichtlich des Prozentsatzes von MRSA an MSSA ist dieser Zusammenhang nicht so deutlich. Das Heim mit der mit 39% höchsten Rate von MRSA im Verhältnis zu MSSA wies eine *Staphylococcus aureus*-Prävalenz von lediglich 38,3% auf und lag damit im Heimvergleich im unteren Drittel.

## **5.2 Risikofaktoren**

An dieser Stelle ist auf einen wichtigen methodischen Unterschied dieser Arbeit zu den Studien, die zum Thema Risikofaktoren zitiert werden, hinzuweisen. Daten zu Risikofaktoren wurden in der vorliegenden Arbeit lediglich von bereits als MRSA-Träger identifizierten Bewohnern erfasst. Entsprechend liegen, im Unterschied zu den zitierten Arbeiten, keine Daten zum statistischen Vergleich der MRSA-besiedelten mit den nicht MRSA-besiedelten Bewohnern vor. Um aus den erfassten Daten über die reine Deskription hinaus statistische Aussagen zu Risikofaktoren machen zu können, wurden die Heime in Prävalenzgruppen aufgeteilt. Statistisch wurde überprüft, ob einzelne Risikofaktoren eine Assoziation zu bestimmten Prävalenzgruppen aufwiesen, also in bestimmten Gruppen gehäuft auftraten. Da die Prävalenzen ja jeweils für einzelne Heimeinrichtungen festgestellt wurden, können im Ergebnis auf diesem Weg statistische Aussagen darüber gemacht werden, ob auf Ebene der Heime ein Zusammenhang zwischen der Häufung einzelner Risikofaktoren und der Tatsache einer hohen Prävalenz besteht. Faktoren, bei denen sich ein entsprechender Zusammenhang nachweisen ließ, wurden als Risikofaktoren eingestuft und umgekehrt. Kritisch muss bemerkt werden, dass das Fehlen einer Kontrollgruppe die Aussagekraft der zu den einzelnen Risikofaktoren erfolgten statistischen Auswertungen mindert.

### **5.2.1 Alter**

Das Ergebnis „geringeres Alter als Risikofaktor“ erstaunt, denn die meisten der bekannten Risikofaktoren resultieren aus typischen Erkrankungen des fortgeschrittenen Lebensalters (z.B. Tragen einer Endoprothese, Harnkatheter, Immobilität), beziehungsweise stellen selber

eine altersassoziierte Erkrankung dar (z.B. offene Wunden, Dekubiti). In mehreren Untersuchungen konnte das Alter entsprechend als Risikofaktor nachgewiesen werden,<sup>190, 192, 256</sup> von von Baum et al. wurde eine statistisch nicht signifikante Tendenz zu höherem Alter als risikoerhöhend beschrieben<sup>233</sup>. In anderen Studien stellte sich das Alter zwar nicht als eigenständiger Risikofaktor heraus,<sup>190, 194</sup> aber auch die Daten dieser Studien wiesen jedoch tendenziell eher in Richtung eines erhöhten Risikos bei höherem Alter. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weichen insofern von der herrschenden Studienlage ab. Lediglich Nillius et al konnten 2016 einen statistisch nicht signifikanten Zusammenhang zwischen höherem Alter und niedrigerer Besiedelungsrate beobachten.<sup>180</sup> Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Studie findet sich bei Betrachtung der Altersstruktur der Bewohner einzelner Einrichtungen. In Einrichtung 10 aus der Gruppe der Heime mit hoher Prävalenz befanden sich vier der insgesamt neun positiv getesteten Bewohner in der Altersgruppe der 50-60-jährigen, drei in der Gruppe der 61-70-jährigen. In der vorliegenden Stichprobe von 114 Bewohnern werden die im Vergleich zu der sonst anzutreffenden Altersstruktur der Heimbewohner stark abweichenden Extremwerte/Ausreißer die Ergebnisse deutlich beeinflusst haben.

### **5.2.2 Dauer des Heimaufenthalts**

Die gewonnenen Daten gaben keinen Anhalt für die Einordnung der Heimaufenthaltsdauer als Risikofaktor einer MRSA-Besiedelung. Dieses Ergebnis entspricht dem mehrerer Studien.<sup>190, 194</sup> Andere Studien kommen zu abweichenden, teils widersprüchlichen Ergebnissen: Während von Neuhaus et al.<sup>169</sup> und Jans et al.<sup>233</sup> eine lange Aufenthaltsdauer als Risikofaktor herausarbeiteten, kommen andere Gruppen zu dem Ergebnis, dass kurze Heimaufenthalte in einem Zusammenhang zu einer MRSA-Besiedelung stehen.<sup>172, 190, 237</sup> Die Heimaufenthaltsdauer lässt sich nach den Daten dieser Untersuchung und bei widersprüchlicher Studienlage nicht als prädisponierender Faktor einer MRSA-Besiedelung werten.

### **5.2.3 Krankenhausaufenthalte**

Bei der statistischen Auswertung der in dieser Studie gewonnenen Daten ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer höheren MRSA-Prävalenz und der Tatsache eines stationären Krankenhausaufenthaltes, der Häufigkeit eines solchen oder der Gesamtaufenthaltsdauer in Krankenhäusern in den letzten 12 Monaten vor Durchführung des Screenings feststellen.

Dieses Ergebnis steht in einem gewissen Widerspruch zu der Vielzahl an Studien, die Krankenhausaufenthalte als Risikofaktoren einer MRSA-Besiedelung nachgewiesen haben.<sup>173, 179, 194, 200, 237 189 186, 192</sup> In lediglich zwei weiteren Untersuchungen, von Eveillard et al.<sup>184</sup> und Stone et al.<sup>183</sup> ließen sich, wie in der vorliegenden Studie, Krankenhausaufenthalte nicht als Risikofaktoren einer MRSA-Besiedelung ausmachen.

#### **5.2.4 Pflegestufe**

Pfingsten-Würzburg et al. haben die Pflegestufe als eigenständigen Risikofaktor herausgearbeitet,<sup>179</sup> bei Neuhaus et al. konnte eine entsprechende, statistisch nicht signifikante Tendenz festgestellt werden.<sup>174</sup> Die vorliegende Studie konnte diese Ergebnisse nicht bestätigen und kommt damit zum gleichen Ergebnis wie Höpken et al.<sup>173</sup> In einigen europäischen Untersuchungen sind bei Heimbewohnern geriatrische Scores erhoben worden, die wesentlich an der Hilfsbedürftigkeit orientiert sind und daher zu einem Vergleich mit den in dieser Studie zu der Pflegestufe erfassten Daten sinnvoll herangezogen werden können. Eveillard et al. konnten mit dem französischen AGGIR-Score einen signifikante Risikoerhöhung nachweisen,<sup>184</sup> Jans et. al mit dem Katz-Score ebenfalls,<sup>239</sup> mit dem Barthel-Index ließ sich von Manzur et al. ein solcher Zusammenhang nicht nachweisen.<sup>190</sup> Die Studienlage ist demnach auch zu diesem Punkt uneinheitlich.

#### **5.2.5 Sonden und Katheter**

Das Liegen von Harnkathetern und Gastrostomiesonden war in der vorliegenden Arbeit nicht mit einer erhöhten MRSA-Prävalenz assoziiert. In der Mehrzahl der Studien erwies sich der entsprechende Parameter (in englischsprachigen Veröffentlichungen meist unter dem Punkt „indwelling devices“ zusammengefasst) hingegen als Risikofaktor einer MRSA-Besiedelung.<sup>173, 174, 184, 190, 233</sup> Murphy et al. konnten auf Ebene der Heime eine Zahl an katheterisierten/mit Gastrostomiesonden versorgten Bewohnern als Prädiktor einer hohen MRSA-Prävalenz ausfindig machen.<sup>182</sup> In der Arbeit von Brugnaro et al. konnte keine Risikoerhöhung festgestellt werden.<sup>194</sup>

#### **5.2.6 Diabetes mellitus**

Auch eine Diabetes mellitus-Erkrankung zeigte keine Assoziation zur MRSA-Prävalenz, das Ergebnis entspricht dem nach Studienlage Erwartbaren.<sup>179, 194, 237, 239 173</sup>

### **5.2.7 Offene Wunden und Geschwüre**

Ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Wunden oder Decubitalgeschwüren und der Zuordnung zu einer der Prävalenzgruppen konnte nicht nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Studienlage ergibt sich erneut ein uneinheitliches Bild mit einer ungefähr gleichgroßen Zahl an Studien, in denen Wunden und Geschwüre als Risikofaktoren eingestuft wurden<sup>180, 184, 190, 239</sup> und solchen, in denen sich ein risikoerhöhender Zusammenhang nicht nachweisen ließ.<sup>186, 194, 237</sup>

### **5.2.8 Größe des Heimes**

Manzur et al. hatten in ihrer Studie eine Heimgröße  $\leq 150$  Betten als unabhängigen Risikofaktor einer MRSA-Besiedelung ausgemacht,<sup>190</sup> von Baum et al. wiesen einen Zusammenhang zwischen einer Heimgröße zwischen 41 und 100 Betten und einem erhöhten MRSA-Risiko nach.<sup>233</sup> In den Studien erwies sich eine vergleichsweise geringe Heimgröße als Risikofaktor einer hohen MRSA-Prävalenz. In der vorliegenden Arbeit wird dieses Risiko bei einer vergleichenden Betrachtung der Heimgrößen unter Einbeziehung der ermittelten MRSA-Prävalenzen schnell offensichtlich, denn die sechs Heime mit den höchsten Prävalenzen hatten eine Bettenzahl von unter 120.

## **5.3 Sensitivität bestimmter Abstrichlokalisationen**

Wie beschrieben wurden in der vorliegenden Untersuchung bei allen Probanden Abstriche aus den Nasenvorhöfen, bei gegebener Risikolokalisation zusätzlich an Katheter-/Sondeninsertionsstellen, offenen Wunden und/oder Ulcera Proben abgenommen. Die bisher durchgeführten Studien zur Sensitivität bestimmter Abstrichlokalisationen im Rahmen von Screeninguntersuchungen kamen zu recht unterschiedlichen Ergebnissen. Als problematisch hat sich eine gastrointestinale Besiedelung herausgestellt, die sich nach den Ergebnissen mehrerer Arbeiten bei Abstrichen an Nasen sowie im Bereich von Hautläsionen und offenen Wunden nur unzureichend nachweisen lässt.<sup>231, 257, 258, 259, 260</sup> In einer 2007 von Zhang et al. veröffentlichten Screeninguntersuchung mittels nasaler und rektaler Abstriche, sowie Abstrichen im Bereich von Hautläsionen (einschließlich offener Wunden und Insertionsstellen) etwa war bei insgesamt 72 von 854 (24%) Krankenhauspatienten eine MRSA-Besiedelung nachgewiesen worden. Bei 17 dieser Patienten war der nasale Abstrich negativ, bei 12 Patienten war die Besiedelung lediglich durch den rektalen Abstrich

nachweisbar, bei 2 Patienten war neben dem rektalen auch der an Hautläsionen abgenommene Abstrich positiv, und nur 3 Patienten waren ausschließlich durch den im Bereich von Hautläsionen abgenommenen Abstrich als MRSA-positiv aufgefallen.<sup>259</sup> Um diesem Problem zu begegnen wird von den entsprechenden Autoren die Abnahme rektaler Abstriche empfohlen.<sup>231, 261</sup> So ließ sich in der Studie von Currie et al. durch Kombination nasaler und rektaler Abstriche eine Sensitivität von 96%, durch Kombination nasaler und Abstriche an Hautläsionen lediglich eine Sensitivität von 73%, und für isolierte Nasenabstriche eine von nur 68% erreichen.<sup>231</sup> Nach Girou et al. ließe sich durch Kombination nasaler-, perianaler- und Rachenabstriche eine Sensitivität von 89% erreichen, wohingegen ein rein nasales Screening lediglich 80% der MRSA-Fälle detektiert.<sup>261</sup>

In einer von Baker et al. vorgenommenen Screeningstudie in einem „veterans affairs hospital“ hingegen hat sich die extranasale und somit auch die gastrointestinale Besiedelung, als eng korreliert mit einer nasalen Besiedelung herausgestellt, so dass eine isoliert-extranasale Besiedelung in lediglich 2% der untersuchten Patienten auftrat.<sup>232</sup> Entsprechend wurden in dieser, aber auch in anderen Studien für isolierte Abstriche aus den Nasenvorhöfen hohe Sensitivitätsraten von 84%<sup>261</sup> bis zu 91%<sup>232</sup> bzw. 93%<sup>232, 262</sup> ermittelt. Sanford et al. haben für eine Kombination von Abstrichen der Nasenvorhöfe und Hautläsionen eine Sensitivität von 100% festgestellt<sup>262</sup>. Die stark abweichenden Untersuchungsergebnisse lassen sich wesentlich auch durch die Unterschiedlichkeit der Studienpopulationen erklären. Der wesentliche Einfluss deren Charakteristika auf die Sensitivität wurde von Bittermann et al. untersucht. Dabei hat sich fortgeschrittenes Alter als wichtigster, die Wahrscheinlichkeit einer parallel nasalen und multilokulären Besiedelung erhöhender Faktor erwiesen.<sup>263</sup> Für die vorliegende Untersuchung mit einer geriatrischen Altersstruktur der Screeningpopulation kann daher von einer hohen Sensitivität eines Screenings mit den Abstrichlokalisationen Nasenvorhöfe und Risikolokalisationen ausgegangen werden.

Dennoch bleibt kritisch festzuhalten, dass auch in der vorliegenden Untersuchung möglicherweise ein geringer Prozentsatz insbesondere gastrointestinaler Besiedelungen nicht nachgewiesen werden konnte. Vor diesem Hintergrund erscheinen die festgestellten hohen Besiedelungsraten in den Saarbrücker Altenheimen noch besorgniserregender. Nach den Ergebnissen dieser Studie ergibt sich, mit der erwähnten Einschränkung möglicher entgangener gastrointestinaler Besiedelungen, eine Sensitivitätsrate des Nasenscreenings von 88,6%. Bei 13 isoliert nichtnasal Besiedelten in dieser Studie und nach Auswertung der

Studienlage muss festgehalten werden, dass isolierte Abstriche aus den Nasenvorhöfen für Screeninguntersuchungen nicht hinreichend sensitiv sind, so dass zur Ermittlung der für bestimmte Populationen und Zielstellungen jeweils optimalen Kombinationen von anatomischen Abstrichlokalisationen weitere Studien notwendig sind. Die hohe Zahl der in dieser Studie neu detektierten Besiedlungsfälle unterstreicht die Effizienz und Wichtigkeit von Screeninguntersuchungen als zentralen Bestandteil einer aktiven Surveillance.

## 5.4 Typisierungsergebnisse

### 5.4.1 Antibiogramme

Informationen über die Resistenzen der in bisherigen Studien in Alten- und Pflegeeinrichtungen in Deutschland isolierten MRSA sind mit einer Ausnahme in den jeweiligen Artikeln und Berichten nicht aufgeführt und daher für einen Vergleich nicht zugänglich. Vergleichsdaten aus Heimeinrichtungen stehen nur aus einer Prävalenzstudie in Homburg/Saar zur Verfügung. In der Studie von Geipel et al. wurden 2003 insgesamt drei MRSA isoliert, alle Isolate zeigten dabei das auch in dieser Studie am häufigsten anzutreffende Resistenzmuster des Rhein-Hessen-Epidemiestammes.

Die im Vergleich mit Daten des NRZ und der PEG auffällige Resistenz aller Isolate gegen Ciprofloxacin (NRZ: 93,8%<sup>264</sup>, PEG: 93,1%<sup>148</sup>) erklärt sich mit der Dominanz des Rhein-Hessen-Epidemiestammes in dieser Untersuchung, zu dessen Charakteristika die Resistenz gegen Ciprofloxacin zählt. Multizentrisch auf nationaler Ebene gesammelte Resistenzdaten enthalten Isolate unterschiedlichster Stämme, was im Ergebnis zum Nachweis weiter gefächerter Resistenzmuster führt.

### 5.4.2 *spa*-Typisierung

Die in der *spa*-Sequenzierung nachgewiesenen Repeatfolgen waren durchweg bekannt und von der Ridom AG bereits als *spa*-Typen definiert sowie auf dem Ridom-*spa*-Server dokumentiert. Der *spa*-Typ t003 ist weltweit anzutreffen<sup>265</sup> und in Deutschland<sup>241, 265</sup> und Europa<sup>145</sup> einer der am häufigsten isolierten Typen. Der am zweithäufigsten isolierte *spa*-Typ t504 ist auf dem Ridom-Server wesentlich seltener dokumentiert, sämtliche Nachweise stammen aus Deutschland. In einer von Schaumburg et al. 2005 durchgeführten epidemiologischen Prävalenzstudie mit klinischen Isolaten waren die *spa*-Typen t003 und t504 die im Saarland überwiegend anzutreffenden *spa*-Typen.<sup>241</sup> Beide *spa*-Typen konnten

auch in einer 2010 vorgenommenen Prävalenzstudie an der Universitätsklinik des Saarlandes<sup>255</sup> sowie in einer Prävalenzstudie in saarländischen Alten- und Pflegeeinrichtungen<sup>180</sup> am häufigsten nachgewiesen werden, sich also langfristig als endemische Klone durchsetzen. Mit gleicher Häufigkeit von drei Isolaten wurden die *spa*-Typen t2379 und t1007 isoliert, auf dem Ridom-Server dokumentierte Nachweise stammen aus Deutschland und Finnland. Für den zweimalig nachgewiesenen *spa*-Typ t837 sind europaweite Nachweise auf dem Ridom-Server dokumentiert. Die weiteren *spa*-Typen wurden in der vorliegenden Studie jeweils einmal nachgewiesen, für den *spa*-Typ t7333 liegen ausschließlich für Deutschland dokumentierte Nachweise der Ridom-Datenbank vor. Für alle weiteren *spa*-Typen sind europa-beziehungsweise weltweite Nachweise festgehalten.

23 der 46 *spa*-typisierten Isolate konnten anhand ihrer klonalen Komplexe (CC) und ihrer Zuordnung zu Sequenztypen nach MLST direkt als Prototyp oder Subklon des Rhein-Hessen-Epidemiestammes identifiziert werden. Betrachtet man die Repeatfolgen der übrigen Isolate, so fällt, mit einer Ausnahme, eine Ähnlichkeit zu den Repeats des Rhein-Hessen-Stammes auf, was eine verwandschaftliche Beziehung nahelegt. Lediglich das als *spa*-Typ t918 ausgewiesene Isolat unterscheidet sich deutlich. Es weist in seiner Repeatfolge eine deutliche Ähnlichkeit zu Isolaten des Berliner Epidemiestammes auf.

Die nachgewiesenen *spa*-Typen und ihre Häufigkeitsverteilung entsprechen insgesamt den nach Literatur und epidemiologischen Datenbanken zu erwartenden Ergebnissen.

Die Verbreitung und Häufigkeit der nachgewiesenen *spa*-Typen gibt die folgende Tabelle wieder, die auf Daten des Ridom *spa*-Servers beruht.

**Tabelle 24: Häufigkeit nachgewiesener *spa*-Typen in dieser Studie, Vergleich mit der Häufigkeit auf dem Ridom-Server, Nachweisländer gem. Ridom-Datenbank (Stand 02.11.2017)**

<i>spa</i> -Typ	Häufigkeit in dieser Studie %	Häufigkeit auf dem Ridom-Server(%)	Länder, aus denen Nachweise vorliegen
t003	45,65%	8,98%	Weltweit
t504	15,22%	0,07%	Deutschland
t2379	6,52%	0,01%	Deutschland, Finnland
t1007	6,52%	≤ 0%	Deutschland
t837	4,35%	0,03%	Europa, Südamerika
t7333	2,17%	≤ 0%	Deutschland
txAI	2,17%	∞	∞
t001	2,17%	0,53%	Weltweit
t002	2,17%	6,83%	Weltweit
t1340	2,17%	0,01%	Deutschland, Irland, Spanien, Norwegen
t105	2,17%	0,20%	Weltweit
t067	2,17%	0,76%	Weltweit
t2235	2,17%	0,02%	Deutschland, Norwegen, Großbritannien, Schweiz
t458	2,17%	0,05%	Weltweit
t918	2,17%	≤ 0%	Norwegen

Bemerkenswert ist der Nachweis eines Isolats des *spa*-Typs t067, der insbesondere in Spanien als multiresistenter Erreger invasiver Erkrankungen in Erscheinung tritt<sup>80</sup> und in Deutschland bislang selten anzutreffen war und ist.<sup>145, 264</sup> Das entsprechende Isolat wies in der Resistenzprüfung das typische Antibiogramm des Rhein-Hessen-Epidemiestammes (A), in der PFGE zeigten sich drei vom Rhein-Hessen-Prototyp abweichende Bande (k).

### 5.4.3 PFGE

31 von 33 der einer PFGE unterzogenen Isolate ließen sich anhand ihres Laufmusters dem Rhein-Hessen Phänotyp zuordnen. Vom mit A gekennzeichneten Rhein-Hessen-Prototyp zeigten sich dabei bis zu vier abweichende Banden, die bestehenden Übereinstimmungen erlaubten eine klare Zuordnung auch dieser Isolate zum Rhein-Hessen-Typ. Zwei der Isolate zeigten das Laufmuster des Barnimer Typs.

### 5.4.4 Vergleich der Typisierungsergebnisse

In dieser Studie kamen unterschiedliche Typisierungsmethoden zum Einsatz. Die diskriminativen Fähigkeiten der Typisierung nach Resistenzmuster sind zu gering als dass die Methode bei der Beurteilung einer Ausbruchssituation ausreichende und hinreichend zuverlässige Informationen über Verwandtschaftsgrade der Isolate geben könnte. In der vorliegenden Untersuchung wiesen mehrere Isolate, die nach den Ergebnissen von PFGE- und *spa*-Typisierung eng verwandt waren, unterschiedliche Antibiogramme auf. Dieses Phänomen abweichender Phäno- und Genotypen ist meist durch den Verlust oder Erwerb resistenzvermittelnder mobiler genetischer Elemente wie Plasmide oder Transposons bedingt.<sup>135</sup> Von den 45 nach molekularen Typisierungsmethoden dem Rhein-Hessen Phänotyp zugerechneten Isolaten konnte mittels Antibiogramm eine solche Verwandtschaft nur bei 24 Isolaten detektiert werden. Die demnach auch in dieser Studie zutage tretenden Defizite der Typisierung nach Antibiogramm sind beschrieben.<sup>266</sup> Die Methode spielt als epidemiologisches Werkzeug daher heute kaum noch eine Rolle.

Der in der vorliegenden Arbeit dokumentierte, sich in einer weiteren Differenzierung einheitlicher *spa*-Typen in differierenden Laufmustern zeigende, höhere Diskriminationsgrad der PFGE im Vergleich zur *spa*-Typisierung entspricht dem nach Studienlage Erwartbaren.<sup>144,</sup>

<sup>242</sup> Nach Interpretation der Laufmuster gemäß den Tenover-Kriterien ergibt sich zwischen den beiden Methoden eine Deckungsgleichheit in der epidemiologischen Einordnung der Isolate. Beide Verfahren kommen bei den 32 beiden Verfahren unterzogenen Isolaten zu dem Ergebnis, dass 31 Isolate dem Rhein-Hessen Phänotyp verwandt sind und ein Isolat dem Berliner Phänotyp angehört.

PFGE und *spa*-Typisierung sind etablierte Verfahren. Die Elektrophorese findet aufgrund ihrer besseren Trennschärfe und trotz des mit ihr verbundenen höheren personellen- und Zeitaufwands insbesondere bei der Untersuchung akuter Ausbrüche zur Anwendung. In

Langzeituntersuchungen kann ihr hoher Diskriminationsgrad das Erkennen phylogenetischer Zusammenhänge jedoch erschweren oder gar verhindern, was die Anwendbarkeit der PFGE in diesem Bereich einschränkt.<sup>143, 267, 268</sup> Als Nachteil der PFGE wird zudem die problematische Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, insbesondere beim Vergleich von in verschiedenen Laboratorien gesammelten Daten, angesehen.<sup>269</sup>

Die *spa*-Typisierung wiederum hat Einschränkungen bei der Untersuchung lokaler Epidemien. Von der Vielzahl bisher nachgewiesener *spa*-Typen (Stand 02.11.2017: 17423) haben sich einige endemisch verbreitet mit dem Ergebnis, dass sie bei einer lokalen Epidemie dominieren und die Klärung epidemiologischer Zusammenhänge mittels *spa*-Typisierung erschwert wird.<sup>270</sup> Es fehlt der *spa*-Typisierung in diesem Fall an Diskriminationsfähigkeit, was an der Beschränkung dieser Methode auf die Sequenzierung lediglich eines kleinen, hochvariablen Genabschnitts beruht. Ein weiteres Problem der *spa*-Typisierung beruht auf einem Genaustausch zwischen nicht verwandten Klonen in dem sequenzierten Bereich, was im Ergebnis zu Homologien und identischen *spa*-Typen nicht verwandter Isolate und damit zu falschen epidemiologischen und klinischen Schlussfolgerungen führen kann.<sup>242, 271</sup> Ein bereits genutzter Weg zur Umgehung der beschriebenen Probleme ist die Sequenzierung weiterer Markerregionen.<sup>270, 271</sup> Den höchsten Diskriminationsgrad epidemiologischer Typisierungsmethoden weist die Ganzgenomsequenzierung (whole genome sequencing; WGS) auf. Die methodischen Fortschritte der vergangenen Jahre ermöglichen eine zunehmend kostengünstige Anwendung, so dass das WGS verspricht, sich als neuer internationaler Goldstandard in der klinischen und wissenschaftlichen Epidemiologie von Krankheitserregern durchsetzen.

## 5.5 Ausbreitungswege

Krankenhausaufenthalte sind der am häufigsten bestätigte singuläre Risikofaktor einer MRSA-Besiedelung in Alten- und Pflegeeinrichtungen. Krankenhäuser stellen den wichtigsten Pool und, aufgrund des hohen Selektionsdrucks durch antibiotische Therapien, maßgeblichen Ort sich neu entwickelnder MRSA dar. Vor dem Hintergrund der hohen durch MRSA-Infektionen verursachten Kosten<sup>211, 219-221</sup> sowie der vom Keim ausgehenden allgemeinen Gesundheitsgefährdung wurden vom Robert-Koch-Institut als Bundesbehörde Präventions- und Kontrollempfehlungen erarbeitet<sup>272</sup> und auf Ebene einzelner Kliniken individuelle Strategien zur MRSA Surveillance entwickelt. Die mit der Prävalenz steigenden Erfahrungen

mit dem Keim haben im klinischen Bereich vielfach zur Etablierung effizienter Maßnahmen zur Prävention der Ausbreitung und zum Management von MRSA geführt.<sup>154, 273</sup>

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen, dass ein gutes MRSA-Management in den Kliniken alleine nicht genügen wird, um die Rate methicillinresistenter *Staphylococcus aureus* als Erreger schwerwiegender nosokomialer Infektionen langfristig zu reduzieren. Denn neben den MRSA-Pools in Kliniken, den caMRSA innerhalb einer steigenden Zahl von Subpopulationen der Allgemeinbevölkerung und den laMRSA in Nutztierbeständen stellen Alten- und Pflegeeinrichtungen ein wichtiges MRSA-Reservoir dar,<sup>274-277</sup> wie auch in der vorliegenden Studie mit einer gemittelten MRSA-Prävalenz von 8,44% gezeigt wurde. Zwischen den Pools existieren einerseits Überschneidungen, beispielsweise bei Aufnahme eines MRSA-besiedelten Heimbewohners in eine Klinik, andererseits bedingen sie sich zum Teil wechselseitig, etwa falls ebenjene MRSA-besiedelten Heimbewohner ihren Keim nosokomial übertragen. Der wechselseitige Einfluss von MRSA-Ausbrüchen in Heimeinrichtungen und Krankenhäusern auf die Prävalenzsituation wurde von Lee et al. 2013 mit einer Software simuliert.<sup>278</sup> Dabei zeigte sich eine wechselseitige Beeinflussung der MRSA-Prävalenzen von Heimen und Krankenhäusern. Ausbrüche in Heimeinrichtungen hatten längerfristig sogar einen Einfluss auf die Prävalenz weiterer regionaler Heimeinrichtungen.<sup>278</sup> In einer Studie aus Hong Kong war, allerdings bei einer MRSA-Prävalenz von 20% in den untersuchten Heimeinrichtungen, eine MRSA-Übertragung in der Heimeinrichtung sogar wahrscheinlicher als im Krankenhaus.<sup>200</sup>

Dennoch werden Alten- und Pflegeeinrichtungen noch zu selten mit in MRSA-Kontrollstrategien einbezogen.<sup>278</sup> Zudem besteht, wie von Autoren der Cochrane Library festgestellt, ein großer Forschungsbedarf in Bezug auf die Übertragung, die Infektionsprävention und Kontrollstrategien von MRSA im speziellen Umfeld von Alten- und Pflegeeinrichtungen.<sup>279</sup> Mittlerweile erscheint eine Fokussierung der die Infektionskontrolle betreffenden Anstrengungen auf den Bereich der Heimeinrichtungen notwendig, um die im Bereich von Krankenhäusern erreichten Erfolge nicht durch eine kontinuierliche Zunahme von MRSA im Pool der Altenpflegeeinrichtungen schon kurzfristig zu gefährden.

## **5.5.1 Lokale Ausbrüche oder Häufung von MRSA in einzelnen Einrichtungen**

In der vorliegenden Studie waren in fast allen Heimeinrichtungen relativ hohe Prävalenzen von MRSA festgestellt worden. Ob es sich in einzelnen Heimen im epidemiologischen Sinne um eine Häufung oder einen Ausbruch handelte, muss unter Einbeziehung der Typisierungsergebnisse und der epidemiologischen Gesamtsituation entschieden werden.

### **5.5.1.1 Einrichtung 3**

Das Heim mit der höchsten Prävalenz von 18,1% ist die Einrichtung 3. In der Einrichtung waren schon vor der Untersuchung die MRSA-Besiedelung von 20 Bewohnern bekannt und bei der Vorabbefragung angegeben worden. Von diesen wurden achtzehn erneut untersucht, alle Untersuchten waren MRSA-positiv, obwohl bei zehn der achtzehn bereits hausärztlicherseits eine Eradikationstherapie eingeleitet, teilweise auch schon mit negativen Abstrichen abgeschlossen wurde. Hinweise auf eine mögliche Ursache der hohen Prävalenz geben die Typisierungsergebnisse. Die vier typisierten Proben zeigten in der *spa*-Typisierung ausschließlich den Typ t003, in der PFGE zeigten sich bis zu drei abweichende Banden, was im Falle eines lokalen Ausbruchs nach den Tenover-Kriterien für ein enges Verwandtschaftsverhältnis der Isolate spricht. Für ein sicheres Urteil hinsichtlich der Frage einer lokalen Epidemie wäre die molekulare Typisierung einer größeren Zahl an Isolaten aus dem Heim hilfreich gewesen. Die Typisierungsergebnisse unterliegen zudem der Einschränkung, dass es sich bei den nachgewiesenen *spa*- und PFGE-Typen um epidemische Klone handelt, deren gehäuftes Auftreten in einer Einrichtung nicht zwangsläufig den Schluss auf einen lokalen Ausbruch zulässt. Dennoch spricht, gerade bei Berücksichtigung der mit 20% auffallend hohen MRSA-Prävalenz unter den getesteten Mitarbeitern, vieles für einen lokalen Ausbruch.

### **5.5.1.2 Einrichtung 10**

Im Heim mit der dritthöchsten Prävalenz von 14% gibt es ebenfalls deutliche Anhaltspunkte für einen lokalen Ausbruch von MRSA. Die sechs *spa*-typisierten Isolate weisen nicht denselben, aber einen in der Repeatfolge sehr ähnlichen *spa*-Typ auf. Die drei einer PFGE unterzogenen Isolate zeigten maximal zwei Banden Abweichung, was ebenfalls für eine enge Verwandtschaft spricht. In dem Heim wurde zudem die mit 18,8% zweithöchste MRSA-

Besiedelungsrate unter Mitarbeitern festgestellt. Dabei war auffällig, dass alle drei positiv getesteten Pflegekräfte in demselben Wohnbereich tätig waren.

### **5.5.1.3 Einrichtung 12**

In Einrichtung 12 wurde bei vier Bewohnern eine Besiedelung festgestellt, wodurch sich eine MRSA-Prävalenz von 11,1% ergab. Der Verdacht auf eine lokale Epidemie ergibt sich im Falle dieses Heimes aus den Ergebnissen der PFGE, in der zwei der drei mittels PFGE typisierten Isolate als solche des Barnimer Phänotyps, und somit eines in der Saar-Region nicht endemischen Stammes, identifiziert wurden. Es handelt sich um die einzigen Isolate, die in dieser Studie nach der PFGE dem Barnimer Phänotyp zugerechnet wurden. Angaben über die Herkunft beider Patienten sind nicht bekannt, die betreffenden Bewohner wohnten in getrennten Zimmern und wiesen beide Aufenthalte in unterschiedlichen regionalen Krankenhäusern auf. Es ist lediglich eines der nach PFGE dem Barnimer Stamm zugehörigen Isolate einer *spa*-Typisierung unterzogen worden, wobei sich der *spa*-Typ t918 nachweisen ließ. In der Einrichtung wurde ein weiteres Isolat einer PFGE unterzogen, wobei sich das Bandenmuster des Rhein-Hessen-Epidemiestammes zeigte. Das vierte MRSA-Isolat wurde nicht mittels PFGE oder *spa*-Typisierung untersucht. Im Antibiogramm dieses Isolates zeigte sich ein für den Barnimer Phänotyp typisches Antibiogramm, was jedoch aufgrund der geringen Trennschärfe der Antibiogramme (siehe unter 4.4.4) wenig aussagekräftig ist. Allein von der Häufung eines regional nicht endemischen MRSA kann im Falle dieser Einrichtung jedoch nicht auf eine Ausbruchssituation geschlossen werden.

## **5.6 MRSA-Prävalenz beim Pflegepersonal**

Wie berichtet, schwankte die Teilnahmebereitschaft des Pflegepersonals erheblich, aus acht von dreizehn Heimen nahmen Mitarbeiter teil. Das Angebot eines MRSA-Screenings löste unter den Mitarbeitern vielfach erhebliche Unsicherheit aus. Mehrfach wurden Befürchtungen hinsichtlich negativer Konsequenzen von Seiten des Arbeitgebers (insbesondere Kündigung des Arbeitsverhältnisses) bei festgestellter MRSA-Besiedelung als Grund einer Nichtteilnahme geäußert. Auf ähnliche Ängste waren Thorstad et al. bei einer Prävalenzstudie in Norwegen gestoßen.<sup>280</sup> Unsicherheit und Angst im Umgang mit MRSA sind oft Ausdruck mangelnder Informationen, auch Heudorf et al. konnten in einer an die Leitungen Frankfurter Heime gerichteten Umfrage ein auf Seiten der Einrichtungen als defizitär empfundenenes Wissen um MRSA dokumentieren.<sup>281</sup> Auch konkrete, dem Personal Sicherheit gebende

Leitfäden zum Umgang mit MRSA, im Klinikbereich längst Standard, fehlten in allen Alten- und Pflegeeinrichtungen. Einschränkend ist daher anzumerken, dass die starken Schwankungen in der Bereitschaft zur Teilnahme und die in fast allen Heimen zu konstatierende geringe Beteiligung der Mitarbeiter die Vergleichbarkeit der Ergebnisse einzelner Heime untereinander und mit denen anderer Untersuchungen limitieren.

Im Vergleich mit den in anderen Untersuchungen nachgewiesenen MRSA-Punktprävalenzen unter Alten- und Pflegeheim-Mitarbeitern liegt die in dieser Studie gemittelte Prävalenz von 4,2% eher im unteren Bereich. So hatten March et al. 2008 in einer Einrichtung eine Mitarbeiterprävalenz von 14,5% festgestellt, allerdings lag in der betreffenden Einrichtung auch die Bewohnerprävalenz mit 38,7% deutlich höher.<sup>256</sup> Studien von Schwaber et al. und Baldwin et al. ermittelten Prävalenzen von 11,% und 7,5%.<sup>276, 185, 282</sup> In der letztgenannten Studie lag die Mitarbeiterprävalenz in drei von 45 untersuchten Einrichtungen sogar über der Prävalenz unter den Bewohnern.<sup>185</sup> Höpken et al. konnten in einem deutschen Heim mit einer hohen Bewohnerprävalenz von 21% eine Mitarbeiterprävalenz von 6% feststellen.<sup>173</sup>

Im Vergleich der Ergebnisse der zitierten Studien fallen in dieser Untersuchung zwei Einrichtungen mit extrem hoher MRSA-Mitarbeiterprävalenz auf. In beiden Einrichtungen lag die MRSA-Mitarbeiterprävalenz über der Prävalenzrate der Bewohner. Es handelt sich um das Heim mit der höchsten Bewohnerprävalenz von 18,1% (Einrichtung 3) sowie um das mit der vierthöchsten Prävalenz von 14% (Einrichtung 10). Die von den Mitarbeitern der Pflegeeinrichtungen gewonnenen Isolate wurden keiner Typisierung unterzogen, die hohen Prävalenzen machen eine Übertragung von MRSA innerhalb der Einrichtung von Mitarbeitern auf Patienten jedoch auch ohne eine Bestätigung durch entsprechende Typisierungsergebnisse wahrscheinlich. Der wesentliche Beitrag des Pflegepersonals bei der Verbreitung von MRSA ist vielfach beschrieben,<sup>245, 283</sup> Pflegekräfte fungieren dabei meist als Vektoren.<sup>244</sup> Baldwin et al. konnten einen Besiedelungsrad des pflegerischen Personals von über 12,5% als eigenständigen Risikofaktor einer MRSA-Kolonisation im Heimbereich nachweisen.<sup>185</sup> Pflegerisches Krankenhauspersonal betreffend mehren sich die Stimmen, die Screeninguntersuchungen auf MRSA außerhalb von akuten Ausbruchssituationen für sinnvoll und notwendig halten, um das stille Reservoir klinisch inapparent besiedelten Pflegepersonals kontrollieren zu können.<sup>244, 284, 285</sup>

Ein routinemäßiges Screening von Pflegepersonal in Heimeinrichtungen wird in der Literatur bislang nur sehr vereinzelt vertreten.<sup>205, 286</sup> Gerade in Ländern mit traditionell eher niedrigen

Prävalenzraten, wie zum Beispiel in Deutschland, wird von vielen Autoren ein generelles Screening von Pflegekräften als nicht notwendig erachtet.<sup>174</sup> Statt dessen werden Schulungen, Fortbildungen und eine generelle Optimierung des Hygienemanagements empfohlen.<sup>174</sup> Andere Autoren zweifeln an der praktischen Umsetzbarkeit von strengen Hygieneleitlinien in Heimeinrichtungen, die ja immer auch das „zu Hause“ der dort lebenden Menschen seien.<sup>256</sup> Vor dem Hintergrund der steigenden Bedeutung des MRSA-Pools in „Alten- und Pflegeeinrichtungen“ sollte, auch unter dem Eindruck der Ergebnisse dieser Studie, ein Routinescreening von pflegerischen Mitarbeitern in Heimeinrichtungen in Deutschland erwogen werden.

## **5.7 Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich mit einer mittleren Prävalenz von 8,44% ein im nationalen Vergleich hoher Besiedelungsgrad von Altenheimbewohnern im Stadtgebiet von Saarbrücken. Die Gesamtschau aus molekularer Typisierung gewonnener Isolate und einer hohen Prävalenz sowohl unter Bewohnern als auch dem Pflegepersonal ließ in zwei Heimeinrichtungen den Rückschluss auf eine lokale Ausbruchssituation zu. Beide Punkte unterstreichen die Bedeutung von Heimeinrichtungen als eigenständiges MRSA-Reservoir sowie die Notwendigkeit klarer Surveillancestrategien in Altenheimen. Zentrale Bestandteile einer Surveillancestrategie sollten ein Aufnahmescreening, eine konsequente Dekolonisation besiedelter Bewohner sowie eine konsequente Befolgen der Hygienerichtlinien, insbesondere die der Handhygiene, durch Pflegepersonal und Heimbewohner sein.<sup>189, 287</sup> Eine Verdichtung der Arbeitsabläufe erschwert die Umsetzung von Hygienerichtlinien, entsprechend wirkt sich ein höherer pflegerischer Betreuungsschlüssel günstig auf Besiedlungsraten in Heimeinrichtungen aus.<sup>287, 288</sup> Die in einzelnen Heimen dieser Studie sehr hohen MRSA-Besiedlungsraten des Pflegepersonals lassen zudem ein Routinescreening von Pflegekräften sinnvoll erscheinen.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Ludwig W, Schleifer KH, Fox GE, Seewaldt E, Stackebrandt E. A phylogenetic analysis of staphylococci, *Peptococcus saccharolyticus* and *Micrococcus mucilaginosus*. *Journal of general microbiology*. 1981; 125(2): 357-66.
2. Peacock S. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. Chichester: John Wiley & Sons; 2006.
3. Paul Vos GG, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer, William B. Whitman. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes*. In: Garrity GM, editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Firmicutes*. New York: Springer; 2009.
4. Pfaller MA, Herwaldt LA. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*. 1988; 1(3): 281-99.
5. Kresken M. HD, Schmitz F.-J., A. WT. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2004. *Antiinfectives Intelligence*. 2006.
6. Ruden H, Gastmeier P, Daschner FD, Schumacher M. Nosocomial and community-acquired infections in Germany. Summary of the results of the First National Prevalence Study (NIDEP). *Infection*. 1997; 25(4): 199-202.
7. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*. 1997; 10(3): 505-20.
8. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008; 46 Suppl 5: S350-9.
9. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual review of microbiology*. 1994; 48: 585-617.
10. Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, et al. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infection and immunity*. 2000; 68(12): 6871-8.
11. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2004; 68(5): 981-1003.
12. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2007; 87(1): 3-9.
13. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical microbiology reviews*. 2004; 17(1): 218-34.
14. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine*. 1998; 339(8): 520-32.
15. Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006; 38(4): 504-9.
16. Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes

- virulence through its antioxidant activity. *The Journal of experimental medicine*. 2005; 202(2): 209-15.
17. Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Gotz F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infection and immunity*. 2006; 74(8): 4950-3.
  18. Proctor RA, Balwit JM, Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infectious agents and disease*. 1994; 3(6): 302-12.
  19. Proctor RA, Peters G. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1998; 27(3): 419-22.
  20. McNamara PJ, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *International journal of antimicrobial agents*. 2000; 14(2): 117-22.
  21. Petrelli D, Repetto A, Di Luca MC, Parente B, Tavolini V, Cao P, et al. Characterization of a *Staphylococcus aureus* strain showing high levels of biofilm formation isolated from a vascular graft: case report. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2008; 21(3): 745-50.
  22. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994; 38(9): 2125-33.
  23. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 2002; 15(2): 167-93.
  24. Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, Xiong YQ. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2004; 40(1): 1-9.
  25. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, et al. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *Journal of bacteriology*. 2001; 183(24): 7341-53.
  26. Chan PF, Foster SJ. Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 1998; 180(23): 6232-41.
  27. Camargo IL, Gilmore MS. *Staphylococcus aureus*--probing for host weakness? *Journal of bacteriology*. 2008; 190(7): 2253-6.
  28. Musher DM, Lamm N, Darouiche RO, Young EJ, Hamill RJ, Landon GC. The current spectrum of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital. *Medicine*. 1994; 73(4): 186-208.
  29. Rammelkamp M. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Med*. 1942; 51: 386-389. *Proceedings of the Royal Society Experimental Biology and Medicine*. 1942; 51: 386-9.
  30. Bondi D. Penicillin resistant staphylococci *Proceedings of the Royal Society Experimental Biology and Medicine*. 1945; 60: 55-8.
  31. Jessen O, Rosendal K, Bulow P, Faber V, Eriksen KR. Changing staphylococci and staphylococcal infections. A ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. *The New England journal of medicine*. 1969; 281(12): 627-35.
  32. Barber. Methicillin resistant staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 1961: 385-93.
  33. Jevons. „Celbenin“-resistant staphylococci. *British Medical Journal*. 1961: 124-5.

34. Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP, Banerjee S, Henderson TS, Tolson JS, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 1992; 13(10): 582-6.
35. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001; 358(9277): 207-8.
36. Mangili A, Bica I, Snyderman DR, Hamer DH. Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005; 40(7): 1058-60.
37. Baird D CJ. Mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 1987; 2(8555): 387-8.
38. Alarcon T, Sanz JC, Blanco F, Domingo D, Lopez-Brea M. High-level mupirocin resistance among Spanish methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 1998; 17(12): 877-9.
39. Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Emergence of high-level mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *The Journal of hospital infection*. 1994; 26(3): 157-65.
40. Naguib MH, Naguib MT, Flournoy DJ. Mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a veterans hospital. *Chemotherapy*. 1993; 39(6): 400-4.
41. Lim TT, Coombs GW, Grubb WB. Genetic organization of *mecA* and *mecA*-regulatory genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australia and England. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2002; 50(6): 819-24.
42. Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson JF, Hiramatsu K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993; 37(6): 1219-26.
43. Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1985; 28(3): 397-403.
44. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 1984; 158(2): 513-6.
45. Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, Mobashery S. The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279(39): 40802-6.
46. Fuda C, Hesek D, Lee M, Morio K, Nowak T, Mobashery S. Activation for catalysis of penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by bacterial cell wall. *Journal of the American Chemical Society*. 2005; 127(7): 2056-7.
47. Ito T, Hiramatsu K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multi-antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei medical journal*. 1998; 39(6): 526-33.
48. IWG-SCC. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements. 2013 [cited; Available from: [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_TypesEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html)]
49. Wu SW, de Lencastre H, Tomasz A. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 2001; 183(8): 2417-24.

50. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000; 44(6): 1549-55.
51. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54(10): 4352-9.
52. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists*. 2011; 60(2): 95-103.
53. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*. 1997; 10(4): 781-91.
54. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(11): 7687-92.
55. Dubin DT, Matthews PR, Chikramane SG, Stewart PR. Physical mapping of the mec region of an American methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1991; 35(8): 1661-5.
56. Morton TM, Johnston JL, Patterson J, Archer GL. Characterization of a conjugative staphylococcal mupirocin resistance plasmid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995; 39(6): 1272-80.
57. CLSI CaLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. LSI document M100-S17 [IS USA; 2007.
58. Tomasz A, Nachman S, Leaf H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1991; 35(1): 124-9.
59. Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1986; 29(1): 85-92.
60. de Lencastre H, Figueiredo AM, Tomasz A. Genetic control of population structure in heterogeneous strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 1993; 12 Suppl 1: S13-8.
61. Finan JE, Rosato AE, Dickinson TM, Ko D, Archer GL. Conversion of oxacillin-resistant staphylococci from heterotypic to homotypic resistance expression. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002; 46(1): 24-30.
62. Niemeyer DM, Pucci MJ, Thanassi JA, Sharma VK, Archer GL. Role of mecA transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 1996; 178(18): 5464-71.
63. Rosato AE, Craig WA, Archer GL. Quantitation of mecA transcription in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of bacteriology*. 2003; 185(11): 3446-52.
64. Rohrer S, Maki H, Berger-Bachi B. What makes resistance to methicillin heterogeneous? *Journal of medical microbiology*. 2003; 52(Pt 8): 605-7.
65. De Lencastre H, Wu SW, Pinho MG, Ludovice AM, Filipe S, Gardete S, et al. Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of

- chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin. *Microb Drug Resist*. 1999; 5(3): 163-75.
66. de Lencastre H, Tomasz A. Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994; 38(11): 2590-8.
  67. Canawati HN, Witte JL, Sapico FL. Temperature effect on the susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to four different cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1982; 21(1): 173-5.
  68. Diederens B, van Duijn I, van Belkum A, Willemse P, van Keulen P, Kluytmans J. Performance of CHROMagar MRSA medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2005; 43(4): 1925-7.
  69. Hindler JA, Inderlied CB. Effect of the source of Mueller-Hinton agar and resistance frequency on the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 1985; 21(2): 205-10.
  70. Hindler JA, Warner NL. Effect of source of Mueller-Hinton agar on detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* using a screening methodology. *Journal of clinical microbiology*. 1987; 25(4): 734-5.
  71. Watanakunakorn C. Effect of inoculum size on in vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to eighteen antimicrobial agents. *European journal of clinical microbiology*. 1985; 4(1): 68-70.
  72. Chambers HF, Hackbarth CJ. Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1987; 31(12): 1982-8.
  73. Madiraju MV, Brunner DP, Wilkinson BJ. Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1987; 31(11): 1727-33.
  74. Sabath LD, Wallace SJ, Gerstein DA. Suppression of intrinsic resistance to methicillin and other penicillins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1972; 2(5): 350-5.
  75. McDougal LK, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *Journal of clinical microbiology*. 1986; 23(5): 832-9.
  76. Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, Jabes D, McDougall L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1989; 33(11): 1869-74.
  77. Nadarajah J, Lee MJ, Louie L, Jacob L, Simor AE, Louie M, et al. Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of medical microbiology*. 2006; 55(Pt 12): 1675-83.
  78. Hackbarth CJ, Kocagoz T, Kocagoz S, Chambers HF. Point mutations in *Staphylococcus aureus* PBP 2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995; 39(1): 103-6.
  79. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 111(9): 1265-73.

80. Perez-Vazquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, Trincado P, et al. Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene ant(4')-Ia and the efflux pump genes msrA/msrB. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009; 63(1): 21-31.
81. Dowding JE. Mechanisms of gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1977; 11(1): 47-50.
82. Layer F, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Witte W. [Current data and trends on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 2012; 55(11-12): 1377-86.
83. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1997; 40(1): 135-6.
84. Ploy MC, Grelaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet*. 1998; 351(9110): 1212.
85. Trakulsomboon S, Danchaivijitr S, Rongrungruang Y, Dhiraputra C, Susaemgrat W, Ito T, et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. *Journal of clinical microbiology*. 2001; 39(2): 591-5.
86. Gardete S, Aires-De-Sousa M, Faustino A, Ludovice AM, de Lencastre H. Identification of the first vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) isolate from a hospital in Portugal. *Microb Drug Resist*. 2008; 14(1): 1-6.
87. Bierbaum G, Fuchs K, Lenz W, Szekat C, Sahl HG. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 1999; 18(10): 691-6.
88. Ike Y, Arakawa Y, Ma X, Tatewaki K, Nagasawa M, Tomita H, et al. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals. *Journal of clinical microbiology*. 2001; 39(12): 4445-51.
89. Nonhoff C, Denis O, Struelens MJ. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in Belgian hospitals. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2005; 11(3): 214-20.
90. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2002; 51(26): 565-7.
91. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006; 42 Suppl 1: S25-34.
92. Showsh SA, De Boever EH, Clewell DB. Vancomycin resistance plasmid in *Enterococcus faecalis* that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001; 45(7): 2177-8.
93. Flannagan SE, Chow JW, Donabedian SM, Brown WJ, Perri MB, Zervos MJ, et al. Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a

- patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA phenotype. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003; 47(12): 3954-9.
94. Perichon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009; 53(11): 4580-7.
  95. Sieradzki K, Tomasz A. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 2003; 185(24): 7103-10.
  96. Sieradzki K, Tomasz A. Gradual alterations in cell wall structure and metabolism in vancomycin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 1999; 181(24): 7566-70.
  97. Moreira B, Boyle-Vavra S, deJonge BL, Daum RS. Increased production of penicillin-binding protein 2, increased detection of other penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997; 41(8): 1788-93.
  98. Finan JE, Archer GL, Pucci MJ, Climo MW. Role of penicillin-binding protein 4 in expression of vancomycin resistance among clinical isolates of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001; 45(11): 3070-5.
  99. Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2003; 41(1): 5-14.
  100. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*. 2010; 23(1): 99-139.
  101. Utaida S, Pfeltz RF, Jayaswal RK, Wilkinson BJ. Autolytic properties of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 50(4): 1541-5.
  102. Voss A, Mouton JW, van Elzakker EP, Hendrix RG, Goessens W, Kluytmans JA, et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (h-GISA). *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2007; 6: 9.
  103. Kim MN, Hwang SH, Pyo YJ, Mun HM, Pai CH. Clonal spread of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a university hospital in Korea. *Journal of clinical microbiology*. 2002; 40(4): 1376-80.
  104. Hayden MK, Rezai K, Hayes RA, Lolans K, Quinn JP, Weinstein RA. Development of Daptomycin resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2005; 43(10): 5285-7.
  105. Bennett JW, Murray CK, Holmes RL, Patterson JE, Jorgensen JH. Diminished vancomycin and daptomycin susceptibility during prolonged bacteremia with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2008; 60(4): 437-40.
  106. Witte FLCCBSGW. Aktuelle Daten und Trends zu Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*. 2012.

107. van Hal SJ, Paterson DL, Gosbell IB. Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naive patient--a review of the literature. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2011; 30(5): 603-10.
108. Sanchez Garcia M, De la Torre MA, Morales G, Pelaez B, Tolon MJ, Domingo S, et al. Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2010; 303(22): 2260-4.
109. Ikeda-Dantsuji Y, Hanaki H, Sakai F, Tomono K, Takesue Y, Honda J, et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 2006 through 2008 at six hospitals in Japan. *Journal of infection and chemotherapy* : official journal of the Japan Society of Chemotherapy. 2011; 17(1): 45-51.
110. Hill RL, Kearns AM, Nash J, North SE, Pike R, Newson T, et al. Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010; 65(3): 442-5.
111. Morales G, Picazo JJ, Baos E, Candel FJ, Arribi A, Pelaez B, et al. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010; 50(6): 821-5.
112. Ender M, McCallum N, Adhikari R, Berger-Bachi B. Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48(6): 2295-7.
113. David MZ, Glikman D, Crawford SE, Peng J, King KJ, Hostetler MA, et al. What is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *The Journal of infectious diseases*. 2008; 197(9): 1235-43.
114. Skiest DJ, Brown K, Cooper TW, Hoffman-Roberts H, Mussa HR, Elliott AC. Prospective comparison of methicillin-susceptible and methicillin-resistant community-associated *Staphylococcus aureus* infections in hospitalized patients. *The Journal of infection*. 2007; 54(5): 427-34.
115. King MD, Humphrey BJ, Wang YF, Kourbatova EV, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Annals of internal medicine*. 2006; 144(5): 309-17.
116. Micek ST, Dunne M, Kollef MH. Pleuropulmonary complications of Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of treatment with antimicrobials inhibiting exotoxin production. *Chest*. 2005; 128(4): 2732-8.
117. Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB, et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *Journal of clinical microbiology*. 2006; 44(1): 108-18.
118. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009; 64(3): 441-6.
119. Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D, Nuebel U. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leukocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007; 60(6): 1258-63.

120. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International journal of antimicrobial agents*. 2012; 39(4): 273-82.
121. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical microbiology reviews*. 2010; 23(3): 616-87.
122. Cuny C, Strommenger B, Witte W, Stanek C. Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital. *Microb Drug Resist*. 2008; 14(4): 307-10.
123. Juhasz-Kaszanyitzky E, Janosi S, Somogyi P, Dan A, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, et al. MRSA transmission between cows and humans. *Emerging infectious diseases*. 2007; 13(4): 630-2.
124. Rich M, Roberts L. MRSA in companion animals. *The Veterinary record*. 2006; 159(16): 535-6.
125. Walther B, Wieler LH, Friedrich AW, Hanssen AM, Kohn B, Brunnberg L, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Veterinary microbiology*. 2008; 127(1-2): 171-8.
126. de Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheuver MG, Dam-Deisz WD, Boshuizen HC, et al. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary microbiology*. 2007; 122(3-4): 366-72.
127. Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PloS one*. 2009; 4(1): e4258.
128. Guardabassi L, Stegger M, Skov R. Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. *Veterinary microbiology*. 2007; 122(3-4): 384-6.
129. van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerging infectious diseases*. 2007; 13(12): 1834-9.
130. Bisdorff B, Scholholter JL, Claussen K, Pulz M, Nowak D, Radon K. MRSA-ST398 in livestock farmers and neighbouring residents in a rural area in Germany. *Epidemiology and infection*. 2012; 140(10): 1800-8.
131. Cuny C, Nathaus R, Layer F, Strommenger B, Altmann D, Witte W. Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PloS one*. 2009; 4(8): e6800.
132. Kock R, Harlizius J, Bressan N, Laerberg R, Wieler LH, Witte W, et al. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2009; 28(11): 1375-82.
133. Wulf MW, Markestein A, van der Linden FT, Voss A, Klaassen C, Verduin CM. First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. *Euro surveillance* : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2008; 13(9).
134. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within

- populations of pathogenic microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998; 95(6): 3140-5.
135. Wichelhaus T SV, Brade V. Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. *Chemotherapie Journal*. 2000; 9(2).
  136. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 1984; 37(1): 67-75.
  137. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995; 33(9): 2233-9.
  138. MLST. [cited; Available from: <http://saureus.beta.mlst.net/>
  139. Hallin M, Denis O, Deplano A, De Ryck R, Crevecoeur S, Rottiers S, et al. Evolutionary relationships between sporadic and epidemic strains of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008; 14(7): 659-69.
  140. Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 1996; 15(1): 60-4.
  141. Brigido Mde M, Barardi CR, Bonjardin CA, Santos CL, Junqueira ML, Brentani RR. Nucleotide sequence of a variant protein A of *Staphylococcus aureus* suggests molecular heterogeneity among strains. *J Basic Microbiol*. 1991; 31(5): 337-45.
  142. Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, Witte W. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*. 2006; 44(7): 2533-40.
  143. Hallin M, Deplano A, Denis O, De Mendonca R, De Ryck R, Struelens MJ. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of clinical microbiology*. 2007; 45(1): 127-33.
  144. Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, de Lencastre H. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of clinical microbiology*. 2008; 46(1): 136-44.
  145. 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 medicine*. 2010; 7(1): e1000215.
  146. Gomes AR, Westh H, de Lencastre H. Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 50(10): 3237-44.
  147. Kresken M. HD, Schmitz F.-J., Wichelhaus T. A. . Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2001. *Antiinfectives Intelligence*. 2003.

148. Kresken M HD, Schmitz F.-J., Wichelhaus TA, . Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenzen der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus den Jahren 2007. *Antiinfectives Intelligence*. 2009.
149. RKI. *Epidemiologisches Bulletin*. Zur Surveillance der Antibiotikaresistenz in Deutschland; 2007.
150. EARSS. *Annual Report 2006; 2007*.
151. ECDC. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. 2011.
152. ECDC. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. 2012.
153. ECDC. *Annual Epidemiological Report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data*; 2013.
154. Vos MC, Behrendt MD, Melles DC, Mollema FP, de Groot W, Parlevliet G, et al. 5 years of experience implementing a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy at the largest university medical center in the Netherlands. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2009; 30(10): 977-84.
155. Hacek DM, Paule SM, Thomson RB, Jr., Robicsek A, Peterson LR. Implementation of a universal admission surveillance and decolonization program for methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) reduces the number of MRSA and total number of *S. aureus* isolates reported by the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2009; 47(11): 3749-52.
156. Lawes T, Edwards B, Lopez-Lozano JM, Gould I. Trends in *Staphylococcus aureus* bacteraemia and impacts of infection control practices including universal MRSA admission screening in a hospital in Scotland, 2006-2010: retrospective cohort study and time-series intervention analysis. *BMJ open*. 2012; 2(3).
157. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2004*. 2004.
158. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2005*. 2005.
159. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2006*. 2006.
160. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2007*. 2007.
161. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2008*. 2008.
162. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2009*. 2009.
163. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2010*. 2010.
164. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2012*. 2012.
165. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2013*. 2013.
166. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2014*. 2014.
167. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2015*. 2015.
168. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2016*. 2016.
169. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2003*. 2003.
170. NRZ. *Referenzdaten MRSA-KISS 2011*. 2011.
171. Heuck D FG, Hamouda O, Claus H, Witte W. Erste Ergebnisse einer überregionalen Studie zur MRSA-Besiedlung bei Bewohnern von Alten- und Pflegeheimen. *Hygiene und Medizin*. 2000; 25: 191-2.

172. Heudorf U, Bremer V, Heuck D. [Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term care facilities for the aged in Frankfurt am Main, Germany, in 1999]. *Gesundheitswesen*. 2001; 63(7): 447-54.
173. Höpken M-E DJ, Braulke C, Heuck D, Witte W. MRSA-Besiedlung in einem Alten- und Pflegeheim: Risikofaktoren und Prävalenz. *Hygiene und Medizin*. 2001; 26: 225-30.
174. Neuhaus B BN, Braulke CH, Heuck C, Witte W. Studie zum Vorkommen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* in Alten- und Pflegeheimen in Nordrhein-Westfalen. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*. 2002; 45: 894-904.
175. Geipel U KF, Migge V, Herrmann M. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in nursing homes in Saarland. *Int J Microbiol*. 2003; Suppl. 36: 294-5.
176. Daeschlein G, Assadian O, Rangous I, Kramer A. Risk factors for *Staphylococcus aureus* nasal carriage in residents of three nursing homes in Germany. *The Journal of hospital infection*. 2006; 63(2): 216-20.
177. Martin US, A-K ; Neuhaus, B ; Karch, H. Flächendesinfektion in Pflegeheimen, was geschieht wirklich? Studie zur Erfolgskontrolle in drei Duisburger Pflegeheimen. *Gesundheitswesen*. 2004; 66(10): 682-7
178. Woltering R, Hoffmann G, Daniels-Haardt I, Gastmeier P, Chaberny IF. [Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients in long-term care in hospitals, rehabilitation centers and nursing homes of a rural district in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2008; 133(19): 999-1003.
179. Pfungsten-Wurzburg S, Pieper DH, Bautsch W, Probst-Kepper M. Prevalence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nursing home residents in northern Germany. *The Journal of hospital infection*. 2011; 78(2): 108-12.
180. Nillius D, von Muller L, Wagenpfeil S, Klein R, Herrmann M. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Saarland, Germany: The Long-Term Care Facility Study. *PloS one*. 2016; 11(4): e0153030.
181. Mody L, Kauffman CA, Donabedian S, Zervos M, Bradley SF. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in nursing home residents. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008; 46(9): 1368-73.
182. Murphy CR, Quan V, Kim D, Peterson E, Whealon M, Tan G, et al. Nursing home characteristics associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Burden and Transmission. *BMC infectious diseases*. 2012; 12: 269.
183. Stone ND, Lewis DR, Johnson TM, 2nd, Hartney T, Chandler D, Byrd-Sellers J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal carriage in residents of Veterans Affairs long-term care facilities: role of antimicrobial exposure and MRSA acquisition. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2012; 33(6): 551-7.
184. Eveillard M, Charru P, Rufat P, Hippeaux MC, Lancien E, Benselama F, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in a long-term care facility: hypothesis about selection and transmission. *Age Ageing*. 2008; 37(3): 294-9.
185. Baldwin NS, Gilpin DF, Hughes CM, Kearney MP, Gardiner DA, Cardwell C, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in residents and staff in nursing homes in Northern Ireland. *J Am Geriatr Soc*. 2009; 57(4): 620-6.

186. Fraise AP, Mitchell K, O'Brien SJ, Oldfield K, Wise R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in nursing homes in a major UK city: an anonymized point prevalence survey. *Epidemiology and infection*. 1997; 118(1): 1-5.
187. Cox RA, Bowie PE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in nursing home residents: a prevalence study in Northamptonshire. *The Journal of hospital infection*. 1999; 43(2): 115-22.
188. Namnyak S, Adhami Z, Wilmore M, Keynes H, Hampton K, Mercieca E, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a questionnaire and microbiological survey of nursing and residential homes in Barking, Havering and Brentwood. *The Journal of infection*. 1998; 36(1): 67-72.
189. Denis O, Jans B, Deplano A, Nonhoff C, De Ryck R, Suetens C, et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among residents of nursing homes in Belgium. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009; 64(6): 1299-306.
190. Manzur A, Gavaldà L, Ruiz de Gopegui E, Mariscal D, Dominguez MA, Perez JL, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and factors associated with colonization among residents in community long-term-care facilities in Spain. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008; 14(9): 867-72.
191. Garcia-Garcia JA, Santos-Morano J, Castro C, Bayoll-Serradilla E, Martin-Ponce ML, Vergara-Lopez S, et al. [Prevalence and risk factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among residents living in long-term care facilities in southern Spain]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2011; 29(6): 405-10.
192. O'Sullivan NR, Keane CT. The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among the residents of six nursing homes for the elderly. *The Journal of hospital infection*. 2000; 45(4): 322-9.
193. Cretnik TZ, Vovko P, Retelj M, Jutersek B, Harlander T, Kolman J, et al. Prevalence and nosocomial spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term-care facility in Slovenia. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2005; 26(2): 184-90.
194. Brugnaro P, Fedeli U, Pellizzer G, Buonfrate D, Rassu M, Boldrin C, et al. Clustering and risk factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in two Italian long-term care facilities. *Infection*. 2009; 37(3): 216-21.
195. Karabay O, Otkun MT, Yavuz MT, Otkun M. Nasal carriage of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in nursing home residents in Bolu, Turkey. *West Indian Med J*. 2006; 55(3): 183-7.
196. Goettsch W, Geubbels E, Wannet W, Hendrix MG, Wagenvoort JH, De Neeling AJ. MRSA in nursing homes in the Netherlands 1989 to 1998: a developing reservoir? *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2000; 5(3): 28-31.
197. Hoogendoorn M, Smalbrugge M, Stobberingh EE, van Rossum SV, Vlaminckx BJ, Thijsen SF. Prevalence of Antibiotic Resistance of the Commensal Flora in Dutch Nursing Homes. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2012.
198. Olofsson M, Lindgren PE, Ostgren CJ, Midlov P, Molstad S. Colonization with *Staphylococcus aureus* in Swedish nursing homes: A cross-sectional study. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2011.
199. Andersson H, Lindholm C, Iversen A, Giske CG, Ortqvist A, Kalin M, et al. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in residents of nursing homes in a Swedish

- municipality: healthcare staff knowledge of and adherence to principles of basic infection prevention. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2012; 44(9): 641-9.
200. Cheng VC, Tai JW, Wong ZS, Chen JH, Pan KB, Hai Y, et al. Transmission of methicillin-resistant staphylococcus aureus in the long term care facilities in Hong Kong. *BMC infectious diseases*. 2013; 13: 205.
  201. Bradley SF. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in nursing homes. *Epidemiology, prevention and management. Drugs Aging*. 1997; 10(3): 185-98.
  202. Neuhaus B NN, Braulke Ch, Heuk C, Witte W. . Methicillin-resistente Staphylococcus aureus in Alten- und Altenpflegeheimen. *Informationen und Empfehlungen zur Verhütung der Weiterverbreitung. . Hygiene und Medizin*. 2002; 24: 72-80.
  203. Strausbaugh LJ, Jacobson C, Sewell DL, Potter S, Ward TT. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in extended-care facilities: experiences in a Veterans' Affairs nursing home and a review of the literature. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 1991; 12(1): 36-45.
  204. Kerttula AM, Lyytikäinen O, Vuopio-Varkila J, Ibrahim S, Agthe N, Broas M, et al. Molecular epidemiology of an outbreak caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a health care ward and associated nursing home. *Journal of clinical microbiology*. 2005; 43(12): 6161-3.
  205. Larssen KW, Jacobsen T, Bergh K, Tvette P, Kvello E, Scheel O. Outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in two nursing homes in Central Norway. *The Journal of hospital infection*. 2005; 60(4): 312-6.
  206. Leendert van der Werff HF, Steen TW, Garder KM, Andersen BM, Rasch M, Jorgen B, et al. [An outbreak of MRSA in a nursing home in Oslo]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny række*. 2008; 128(23): 2734-7.
  207. Safdar N, Bradley EA. The risk of infection after nasal colonization with Staphylococcus aureus. *The American journal of medicine*. 2008; 121(4): 310-5.
  208. Blot S, Depuydt P, Vandewoude K, De Bacquer D. Measuring the impact of multidrug resistance in nosocomial infection. *Current opinion in infectious diseases*. 2007; 20(4): 391-6.
  209. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003; 36(1): 53-9.
  210. Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Behnke M, Daschner F, Ruden H. Mortality risk factors with nosocomial Staphylococcus aureus infections in intensive care units: results from the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS). *Infection*. 2005; 33(2): 50-5.
  211. Reed SD, Friedman JY, Engemann JJ, Griffiths RI, Anstrom KJ, Kaye KS, et al. Costs and outcomes among hemodialysis-dependent patients with methicillin-resistant or methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2005; 26(2): 175-83.
  212. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in Staphylococcus aureus bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infection control and hospital*

- epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America. 2005; 26(2): 166-74.
213. Zahar JR, Clec'h C, Tafflet M, Garrouste-Orgeas M, Jamali S, Mourvillier B, et al. Is methicillin resistance associated with a worse prognosis in *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005; 41(9): 1224-31.
  214. Shurland S, Zhan M, Bradham DD, Roghmann MC. Comparison of mortality risk associated with bacteremia due to methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2007; 28(3): 273-9.
  215. Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, et al. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. *The Journal of infectious diseases*. 2012; 205(5): 798-806.
  216. Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, et al. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS pathogens*. 2012; 8(4): e1002626.
  217. Bundesgesundheitsblatt. Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus-aureus* Stämmen (MRSA) in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen. 1999.
  218. Kanerva M, Blom M, Tuominen U, Kolho E, Anttila VJ, Vaara M, et al. Costs of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of hospital infection*. 2007; 66(1): 22-8.
  219. Herr CE, Heckrodt TH, Hofmann FA, Schnettler R, Eikmann TF. Additional costs for preventing the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and a strategy for reducing these costs on a surgical ward. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2003; 24(9): 673-8.
  220. Kim T, Oh PI, Simor AE. The economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2001; 22(2): 99-104.
  221. Chaix C, Durand-Zaleski I, Alberti C, Brun-Buisson C. Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a cost-benefit analysis in an intensive care unit. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999; 282(18): 1745-51.
  222. Lodise TP, McKinnon PS. Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2005; 52(2): 113-22.
  223. Kopp BJ, Nix DE, Armstrong EP. Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. *The Annals of pharmacotherapy*. 2004; 38(9): 1377-82.
  224. Filice GA, Nyman JA, Lexau C, Lees CH, Bockstedt LA, Como-Sabetti K, et al. Excess costs and utilization associated with methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* infection. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2010; 31(4): 365-73.
  225. Gould IM, Reilly J, Bunyan D, Walker A. Costs of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its control. *Clinical microbiology and infection :*

- the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010; 16(12): 1721-8.
226. Nelson RE, Samore MH, Smith KJ, Harbarth S, Rubin MA. Cost-effectiveness of adding decolonization to a surveillance strategy of screening and isolation for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010; 16(12): 1740-6.
  227. Kang J, Mandsager P, Biddle AK, Weber DJ. Cost-effectiveness analysis of active surveillance screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an academic hospital setting. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2012; 33(5): 477-86.
  228. Robotham JV, Graves N, Cookson BD, Barnett AG, Wilson JA, Edgeworth JD, et al. Screening, isolation, and decolonisation strategies in the control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units: cost effectiveness evaluation. *BMJ*. 2011; 343: d5694.
  229. Wassenberg MW, Kluytmans JA, Box AT, Bosboom RW, Buiting AG, van Elzaker EP, et al. Rapid screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using PCR and chromogenic agar: a prospective study to evaluate costs and effects. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010; 16(12): 1754-61.
  230. Capitano B, Leshem OA, Nightingale CH, Nicolau DP. Cost effect of managing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term care facility. *J Am Geriatr Soc*. 2003; 51(1): 10-6.
  231. Currie A, Davis L, Odrobina E, Waldman S, White D, Tomassi J, et al. Sensitivities of nasal and rectal swabs for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in an active surveillance program. *Journal of clinical microbiology*. 2008; 46(9): 3101-3.
  232. Baker SE, Brecher SM, Robillard E, Strymish J, Lawler E, Gupta K. Extranasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at admission to an acute care Veterans Affairs hospital. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2010; 31(1): 42-6.
  233. von Baum H, Schmidt C, Svoboda D, Bock-Hensley O, Wendt C. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in residents of German nursing homes. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2002; 23(9): 511-5.
  234. Manzur A, Gudiol F. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term-care facilities. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2009; 15 Suppl 7: 26-30.
  235. Mendelson G, Yearmack Y, Granot E, Ben-Israel J, Colodner R, Raz R. *Staphylococcus aureus* carrier state among elderly residents of a long-term care facility. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2003; 4(3): 125-7.
  236. Asoh N, Masaki H, Watanabe H, Watanabe K, Mitsusima H, Matsumoto K, et al. Molecular characterization of the transmission between the colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to human and environmental contamination in geriatric long-term care wards. *Intern Med*. 2005; 44(1): 41-5.
  237. Vovko P, Retelj M, Cretnik TZ, Jutersek B, Harlander T, Kolman J, et al. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-

- term-care facility in Slovenia. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2005; 26(2): 191-5.
238. Law MR, Gill ON. Hospital-acquired infection with methicillin-resistant and methicillin-sensitive staphylococci. *Epidemiology and infection*. 1988; 101(3): 623-9.
239. Jans B, Schoevaerdt D, Huang T, Berhin C, Latour K, Bogaerts P, et al. Epidemiology of Multidrug-Resistant Microorganisms among Nursing Home Residents in Belgium. *PLoS medicine*. 2013; 8(5).
240. Witte W, Braulke C, Cuny C, Heuck D, Kresken M. Changing pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from German hospitals. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2001; 22(11): 683-6.
241. Schaumburg F, Kock R, Mellmann A, Richter L, Hasenberg F, Kriegeskorte A, et al. Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period. *Journal of clinical microbiology*. 2012; 50(10): 3186-92.
242. Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, de Ryck R, et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *Journal of clinical microbiology*. 2007; 45(6): 1830-7.
243. Babouee B, Frei R, Schultheiss E, Widmer AF, Goldenberger D. Comparison of the DiversiLab repetitive element PCR system with spa typing and pulsed-field gel electrophoresis for clonal characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2011; 49(4): 1549-55.
244. Albrich WC, Harbarth S. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *The Lancet infectious diseases*. 2008; 8(5): 289-301.
245. Ben-David D, Mermel LA, Parenteau S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission: the possible importance of unrecognized health care worker carriage. *American journal of infection control*. 2008; 36(2): 93-7.
246. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews*. 1993; 6(4): 428-42.
247. Gagliotti C, Balode A, Baquero F, Degener J, Grundmann H, Gur D, et al. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2011; 16(11).
248. Dulon M, Haamann F, Peters C, Schablon A, Nienhaus A. MRSA prevalence in European healthcare settings: a review. *BMC infectious diseases*. 2011; 11(1): 138.
249. Robicsek A, Beaumont JL, Paule SM, Hacek DM, Thomson RB, Jr., Kaul KL, et al. Universal surveillance for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 3 affiliated hospitals. *Annals of internal medicine*. 2008; 148(6): 409-18.
250. Popp A. MRSA in Thüringen: Prävalenz in Alten- und Pflegeheimen sowie bei ambulanten und stationären Patienten. *Hygienekongress 2011, . Dresden, 03.12.2011; 2011*.
251. Korte J. Projektbericht über ein regionales Netzwerk zur Intensivierung von Präventionsstrategien bei MRSA im Kreis Schleswig-Flensburg, gefördert aus dem Schleswig-Holstein Fonds im Rahmen der zweiten Phase der Gesundheitsinitiative Schleswig-Holstein. In: Korte FGJ, Schleswig-Flensburg K, editors.; 2010.

252. MRE EN. MRSA-Eintages-Prävalenz in Essen 2009.
253. Iris F Chaberny AB, D Sohr, P Gastmeier. A point-prevalence study for MRSA in a German university hospital to identify patients at risk and to evaluate an established admission screening procedure. *Infection*. 2008; 36(6): 526-32.
254. Kock R, Brakensiek L, Mellmann A, Kipp F, Henderikx M, Harmsen D, et al. Cross-border comparison of the admission prevalence and clonal structure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of hospital infection*. 2009; 71(4): 320-6.
255. Ruffing U, Akulenko R, Bischoff M, Helms V, Herrmann M, von Muller L. Matched-cohort DNA microarray diversity analysis of methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital admission patients. *PloS one*. 2012; 7(12): e52487.
256. March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Bottcher A, Slegel F, et al. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010; 16(7): 934-44.
257. Boyce JM, Havill NL, Otter JA, Adams NM. Widespread environmental contamination associated with patients with diarrhea and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of the gastrointestinal tract. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2007; 28(10): 1142-7.
258. Boyce JM, Havill NL, Maria B. Frequency and possible infection control implications of gastrointestinal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2005; 43(12): 5992-5.
259. Zhang SX, Drews SJ, Tomassi J, Katz KC. Comparison of two versions of the IDI-MRSA assay using charcoal swabs for prospective nasal and nonnasal surveillance samples. *Journal of clinical microbiology*. 2007; 45(7): 2278-80.
260. French GL. Methods for screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2009; 15 Suppl 7: 10-6.
261. Girou E, Pujade G, Legrand P, Cizeau F, Brun-Buisson C. Selective screening of carriers for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in high-risk hospital areas with a high level of endemic MRSA. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1998; 27(3): 543-50.
262. Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1994; 19(6): 1123-8.
263. Bitterman Y, Laor A, Itzhaki S, Weber G. Characterization of the best anatomical sites in screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2010; 29(4): 391-7.
264. RKI. Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010. *Epidemiologisches Bulletin*. 2011.
265. Ridom-Server.

266. Back NA, Linnemann CC, Jr., Pfaller MA, Staneck JL, Morthland V. Recurrent epidemics caused by a single strain of erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*. The importance of molecular epidemiology. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1993; 270(11): 1329-33.
267. Blanc DS, Francioli P, Hauser PM. Poor value of pulsed-field gel electrophoresis to investigate long-term scale epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2002; 2(2): 145-8.
268. Tang YW, Waddington MG, Smith DH, Manahan JM, Kohner PC, Highsmith LM, et al. Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2000; 38(4): 1347-51.
269. Cookson BD, Aparicio P, Deplano A, Struelens M, Goering R, Marples R. Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology*. 1996; 44(3): 179-84.
270. Strommenger B, Braulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nubel U, et al. spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *Journal of clinical microbiology*. 2008; 46(2): 574-81.
271. Basset P, Nubel U, Witte W, Blanc DS. Evaluation of adding a second marker to overcome *Staphylococcus aureus* spa typing homoplasies. *Journal of clinical microbiology*. 2012; 50(4): 1475-7.
272. Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen (MRSA) in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz. 1999; (42): 954-8.
273. Hartstein AI, Denny MA, Morthland VH, LeMonte AM, Pfaller MA. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a hospital and an intensive care unit. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 1995; 16(7): 405-11.
274. Mylotte JM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term care facilities. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 1991; 12(5): 274, 6, 8.
275. Kauffman CA, Bradley SF, Terpenning MS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term care facilities. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 1990; 11(11): 600-3.
276. Garazi M, Edwards B, Caccavale D, Auerbach C, Wolf-Klein G. Nursing homes as reservoirs of MRSA: myth or reality? *Journal of the American Medical Directors Association*. 2009; 10(6): 414-8.
277. Barr B, Wilcox MH, Brady A, Parnell P, Darby B, Tompkins D. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among older residents of care homes in the United Kingdom. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2007; 28(7): 853-9.
278. Lee BY, Bartsch SM, Wong KF, Singh A, Avery TR, Kim DS, et al. The importance of nursing homes in the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among hospitals. *Medical care*. 2013; 51(3): 205-15.

279. Hughes C, Smith M, Tunney M, Bradley MC. Infection control strategies for preventing the transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in nursing homes for older people. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2011; (12): CD006354.
280. Thorstad M, Sie I, Andersen BM. MRSA: A Challenge to Norwegian Nursing Home Personnel. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2011; 2011: 197683.
281. Heudorf U. Umfrage zu MRSA in Alten- und Pflegeheimen in Frankfurt am Main. *Hygiene und Medizin*. 2003; 28(4).
282. Schwaber MJ, Masarwa S, Navon-Venezia S, Kandlik Y, Chmelnitsky I, Smollan G, et al. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among residents and staff of long-term care facilities, involving joint and parallel evolution. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011; 53(9): 910-3.
283. Bertin ML, Vinski J, Schmitt S, Sabella C, Danziger-Isakov L, McHugh M, et al. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in a neonatal intensive care unit epidemiologically linked to a healthcare worker with chronic otitis. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2006; 27(6): 581-5.
284. Hail C, Fletcher S, Archer R, Jones G, Jayarajah M, Frame J, et al. Prolonged outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cardiac surgery unit linked to a single colonized healthcare worker. *The Journal of hospital infection*. 2013; 83(3): 219-25.
285. Hawkins G, Stewart S, Blatchford O, Reilly J. Should healthcare workers be screened routinely for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? A review of the evidence. *The Journal of hospital infection*. 2011; 77(4): 285-9.
286. Horner C, Wilcox M, Barr B, Hall D, Hodgson G, Parnell P, et al. The longitudinal prevalence of MRSA in care home residents and the effectiveness of improving infection prevention knowledge and practice on colonisation using a stepped wedge study design. *BMJ open*. 2012; 2(1): e000423.
287. Chamchod F, Ruan S. Modeling the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nursing homes for elderly. *PloS one*. 2012; 7(1): e29757.
288. Daud-Gallotti RM, Costa SF, Guimaraes T, Padilha KG, Inoue EN, Vasconcelos TN, et al. Nursing workload as a risk factor for healthcare associated infections in ICU: a prospective study. *PloS one*. 2012; 7(12): e52342.

## 7 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

AGGIR	autonomie gérontologique groupes iso-ressources
agr	accessory gene regulator
aux	auxiliary genes
BORSA	borderline-Oxacillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
caMRSA	community associated Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
CC	klonaler Komplex
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
ccr	cassette chromosome recombinase
ECDC	European Center for Disease Control
EMRSA	epidemischer Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
fem	factors essential for methicillin resistance
EARS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
haMRSA	hospital-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
laMRSA	livestock-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MHK	minimale Hemm-Konzentration
MLST	Multi-Locus-Sequenz-Typisierung
MSCRAMMs	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MRE	multiresistente Erreger
MSSA	Methicillin-sensible <i>Staphylococcus aureus</i>
NRZ	Nationales Referenzzentrum für Surveillance nosokomialer Infektionen
ORF	open reading frames
PBP	Penicillin-bindendes Protein

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Perkutane Endoskopische Gastrostomie
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PVL	Panton–Valentine Leukozidin
RKI	Robert-Koch-Institut
SCC	Staphylococcal Cassette Chromosome
SCV	small-colony-variants
<i>spa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A-Gen
ST	Sequenz Typ
TCRS	two-component regulatory systems
TSST-1	Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin-1
VISA	Vancomycin-intermediär-sensible <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vancomycin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
WGS	Ganzgenomsequenzierung (whole genome sequencing)

# Durchführungsprotokoll der Pulsfeldgelelektrophorese

	<b>Universitätsklinikum des Saarlandes Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene</b>	Seite 115 von 143
		Version:

<b>Titel:</b>	<b>PULSFELD – GELELEKTROPHORESE (PFGE)</b>
<b>Anlage:</b>	
<b>Dokumentenart:</b>	

## 1 Allgemeine Angaben

## 2 Indikation der Untersuchung

Um unterschiedliche Stämme innerhalb einer Art (z.B. Staphylococcus aureus oder Enterobacter cloacae) voneinander abzugrenzen oder Verwandtschaftsgrade zu bestimmen wird die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) verwendet. Diese Methode hat sich vor allem bei Ausbruchserkrankungen und / oder einer Infektuellensuche etabliert.

## 3 Anforderungen an das Untersuchungsgut

Es werden frische Reinkulturen auf Blutagar benötigt.

## 4 Prinzip des Untersuchungsverfahrens

Nachdem die genomische DNA isoliert und gereinigt ist, wird ein enzymatischer Verdau mit Sma I bei Staphylococcus aureus oder Xba I bei Enterobacter cloacae durchgeführt. Die entstehenden Fragmente haben eine Größe von 10 bis 700 kb. In einem normalen Agarosegel wäre eine Auftrennung der Fragmente problematisch, da der Siebeffekt der Agarose Fragmente über 20 kb nicht auftrennt.

Bei der PFGE wechselt die Richtung des elektrischen Feldes in einem anfangs schnellen und später langsameren Rhythmus (Pulszeit). Nach jedem Wechsel richten sich die negativ geladenen DNA-Fragmente neu im elektrischen Feld aus. Die Laufrichtung der DNA-Fragmente schließt einen Winkel von 120 ° ein.

Die Laufgeschwindigkeit der Fragmente ist abhängig von der Pulszeit, der Spannung und dem Winkel zwischen den Polen. Da die Pulszeit am Anfang sehr gering ist, wandern große Fragmente zu Beginn nicht, da nach der Ausrichtung im elektrischen Feld, keine Zeit mehr für eine Bewegung entlang des Spannungsgradienten verbleibt.

Kleinere Fragmente wandern schneller, die Laufstrecke verlängert sich zwar auch durch den Richtungswechsel, aber meistens sind sie auf dem Gel nicht mehr sichtbar. Die Pulszeiten werden dann kontinuierlich verlängert, so dass auch die großen

Fragmente in Reihenfolge ihres Molekulargewichtes mit der Wanderung durch das Gel beginnen.

## 5 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

<b>Lösungen, die hergestellt werden müssen</b>	<b>Verbrauchsmaterialien und Geräte</b>
<p>Brain-Heart –Infusion Oxoid Art. -Nr. CM 225 (Herstellung und Abfüllung in unserer Nährbodenküche)</p> <p><b>PIV – Puffer :</b></p> <p>1,576 g TRIS-HCL 58,000 g NaCL ph 8,0 mit ca. 6,0 ml 1n NaOH-Lösung einstellen, ad 1000 ml mit aqua dest auffüllen (pH-Wert Kontrolle mit pH – Meter erforderlich! - autoklavieren -</p> <p><b><u>2% ige Low Melt- Point-Agarose in PIV - Puffer:</u></b> 10 ml PIV – Puffer 0,200 g LMP-Agarose in der Mikrowelle homogen zur Lösung bringen,im Wasserbad bei ca. 50 ° C abkühlen lassen ( kann zu je 0,5 ml aliquotiert und bei 4 ° C gelagert werden)</p> <p><b><u>Lysis-Stammlösung:</u></b> 17,4 g NaCL (1M) 11,17 g EDTA (0,1M) 0,29g TRIS-HCL (6mM) 0,60g N-Lauroylsarkosin (2mg/ml) (+ ca.35ml 1n NaOH-Lösung) ad 300ml mit aqua dest auffüllen; ph 8,0 einstellen (pH-Wert Kontrolle mit pH – Meter erforderlich! - autoklavieren –</p>	<p>50 ml Schraubverschluss-Röhrchen Sarstedt Art. -Nr.62.547.254</p> <p>37 ° C Brutschrank</p> <p>Hettich-Zentrifuge Rotina 420 R</p> <p>sterile Glas Schraubverschluss-Röhrchen aus der Nährbodenküche</p> <p>Nephelometer ( siehe Differenzierungs-Platz)</p> <p>NaCL über die Apotheke der UKH erhältlich</p> <p>TRIS-HCL Merck Art. -Nr.1.08219</p> <p>1 n NaOH –Lösung über die Apotheke der UKH erhältlich</p> <p>Laborwaage</p> <p>Spatel und Abwäge-Utensilien</p> <p>Low Melt- Point-Agarose BIO- RAD Art. -Nr. 161-3111</p> <p>Mikrowellengerät</p> <p>Plug Mold BIO- RAD Art. -Nr. 170 3706</p> <p>1,5 ml – Reaktionsgefäße Sarstedt Art. -Nr. 720.690.001</p> <p>EDTA</p>

<p><b><u>Lysis-Lösung:</u></b></p> <p>5ml Lysis-Stammlösung  30 µl RNase-Lösung (10mg/ml in PIV-Puffer)  55 µl Lysozym-Lösung (10mg/ml in aqua dest.)  55 µl Lysostaphin-Lösung (5 mg/ml in aqua dest.)</p> <p><b><u>RNase-Lösung (10mg/ml)</u></b>  5,0 ml PIV-Puffer  50 mg RNase  lösen ; ( kann zu je 0,1 ml aliquotiert und bei – 20 °C gelagert werden)</p> <p><b><u>Lysozym-Lösung (10mg/ml)</u></b>  10 ml aqua dest.  100 mg Lysozym  lösen ;  ( kann zu je 0,25 ml aliquotiert und bei – 20 °C gelagert werden)</p> <p><b><u>Lysostaphin-Lösung (5 mg/ml)</u></b>  400 µl aqua dest  2 mg Lysostaphin  lösen ;  ( kann zu je 60 µl aliquotiert und bei – 20 °C gelagert werden)</p>	<p>Roth Art. -Nr.8043,2</p> <p>N-Lauroylsarkosin  Sigma Art. -Nr. L – 9150</p> <p>Thermoblock</p> <p>Einmal- Pasteurpipetten  Sarstedt Art. -Nr. 86.1172  (gassterilisiert im Gelände der UKH ; erhältlich über unsere Spülküche)</p> <p>Eppendorf –Pipetten</p> <p>Biosphere-Einmal- Pipettenspitzen für alle Eppendorf-Pipetten über Sarstedt</p> <p>13 ml Schraubverschluss-Röhrchen  Sarstedt Art. -Nr.60.540.022</p> <p>Wasserbad 37° C</p> <p>RNase  Roche Art. -Nr.109 169</p> <p>Lysozym  Merck Art. Nr.1.05281.0010</p> <p>Lysostaphin  Sigma Art. -Nr. L - 4402</p>
---	---

<p><b><u>ES-Lösung:</u></b>  93,06g EDTA (0,5 M)  5,0g N-Lauroylsarkosin (1%)  (ca.50 ml aqua dest. zugeben und dann so viel 1n NaOH-Lösung zusetzen, bis die Lösung klar wird - ca 390ml) ad 500ml mit aqua dest auffüllen; ph 9,0 evtl.mit 1n NaOH-Lösung einstellen (pH-Wert Kontrolle mit pH – Meter erforderlich!  - autoklavieren –</p> <p><b><u>Proteinase K- Lösung (10x)</u></b>  10 ml ES-Lösung (s.o.)  100 mg Proteinase K  in Lösung bringen  ( kann zu je 0,5 ml aliquotiert und bei – 20 °C gelagert werden)</p> <p><b><u>ESP-Lösung :</u></b>  0,5 ml Proteinase K- Lösung (10x)  zu 4,5 ml ES- Lösung geben</p> <p><b><u>TE-Puffer:</u></b>  6,304g TRIS-HCL (10mM)  1,490g EDTA (1mM)  ca 10 ml 1n NaOH-Lösung  ad 4000 ml mit aqua dest auffüllen; ph 7,5 evtl.mit 1n NaOH-Lösung einstellen (pH-Wert Kontrolle mit pH – Meter erforderlich!  - autoklavieren –</p> <p><b><u>Sure Cut Buffer (1x):</u></b>  benötigte Menge  Sure Cut Buffer (10x)  1: 10 mit autoklaviertem aqua dest. (PCR grade –  z. B. aus Millipore-Anlage) verdünnen;</p>	<p>Wasserbad 50° C</p> <p>Proteinase K  Merck Art. Nr.1.24568.0500</p> <p>Sure Cut Buffer (10x)  Roche Art. -Nr.11 417 959 001</p> <p>Sma 1  Roche Art. -Nr. z.B.</p>
---	---

<p>restlichen 10 x konz. Puffer wieder bei -20 ° C tieffrieren</p> <p><u>Buffer Tango (1x)</u> benötigte Menge Buffer Tango (10x) 1: 10 mit autoklaviertem aqua dest. (PCR grade – z. B. aus Millipore-Anlage) verdünnen; restlichen 10 x konz. Puffer wieder bei -20 ° C tieffrieren</p> <p><b><u>TBE-Puffer (0,5x)</u></b></p> <p>2.225 ml aqua dest. 225 ml TBE-Puffer (10 x) für eine Kammerbefüllung frisch ansetzen ; zur Lagerung autoklavieren</p> <p><b><u>1 % Pulsed Field Certified Agarose</u></b> 90 ml TBE-Puffer (0,5x) 0,9 g Pulsed Field Certified Agarose in der Mikrowelle homogen zur Lösung bringen, im Wasserbad bei ca. 50 ° C abkühlen lassen und ohne Blasenbildung in den Gießstand geben und Probenkamm einsetzen. Gel 30 min bei Raumtemperatur polymerisieren lassen, dann 15 min in den Kühlschrank stellen.</p> <p><b><u>Ladepuffer</u></b> 200 mg EDTA 20 g Saccharose 15 mg Bromphenolblau ad 50 ml mit aqua dest. auffüllen und bei 4°C lagern</p>	<p>10 656 348 001</p> <p>*Buffer Tango (10x) Fermentas Art. –Nr. BY 5</p> <p>*Xba 1 Fermentas Art. –Nr. ER 0681</p> <p>*Alle Fermentas – Artikel können über Herrn Spohn in der Biochemie (Tel.: 26044) bestellt und bezogen werden. Unsere Kundennummer lautet 41 660. Abholung täglich in der Biochemie zwischen 13:00 - 14:00 h möglich.</p> <p>TBE-Puffer (10x) Appli Chem Art. –Nr. A 0972,1000</p> <p>Pulsed Field Certified Agarose, DNA grade) BIO- RAD Art. -Nr. 162-0137</p> <p>Gießstände und Probenkämme für PFGE- Agarosegel</p> <p>Saccharose über die Apotheke der UKH erhältlich</p> <p>Bromphenolblau Merck Art. Nr.1.11746.0005</p>
--	---

<p><b><u>1% ige Low Melt- Point-Agarose in 0,5 x konz. TBE - Puffer:</u></b>  10 ml 0,5 x konz. TBE - Puffer  0,100 g LMP-Agarose  in der Mikrowelle homogen zur Lösung bringen, im Wasserbad bei ca. 50 ° C abkühlen lassen  ( kann zu je 1,0 ml aliquotiert und bei 4 °C gelagert werden)</p> <p><b><u>Ethidiumbromid- Färbelösung (Konzentration = 1,5 µl/ml EBR Färbelösung):</u></b>  30 µl 1% ige Ethidiumbromid-Lösung auf 200 ml H<sub>2</sub>O geben</p>	<p>Einmalskalpelle, steril  Braun Art. -Nr.5518075</p> <p>Ladder  Promega Art. -Nr.G 301 A</p> <p>CHEF- DR III Pulsed Field Electrophoresis Systems (BIO- RAD)  (Pulsfeldgelelektrophoreseapparatur)</p> <p>1% ige Ethidiumbromid-Lösung  Roth Art. -Nr.2218.2</p> <p>Plexiglas – Schaufel</p> <p>Wannen für  PFGE- Agarosegel</p> <p>Rocky - Schwenkgerät</p> <p>Vernichtungsbeutel  Sarstedt Art. -Nr.86.1197</p> <p>ChemiDoc XRS- Geldokumentations- System</p>
---	--

## 6 Durchführung der Untersuchung

Die Untersuchung gliedert sich in die folgenden verschiedenen Schritte:

<p>Anzucht der Bakterien</p>	<p>Die zu untersuchenden Stämme werden vom Labor in Form von Reinkulturen auf Blutagar angeliefert. Eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes in 25 ml sterile Brain-Heart –Infusion einimpfen und über Nacht bei 37 ° C im Brutschrank inkubieren. Zur Sterilitätskontrolle immer ein unbeimpftes BHI-Medium mitführen. Bewachsene Bouillons mit Programm 2 in der Hettich-Zentrifuge Rotina 420 R (bei 4 ° C für 15 min bei 4.500 UpM) zentrifugieren. Das Pellet nun 2 - mal mit je 25 ml PIV – Puffer waschen. Hierfür ebenfalls Programm 2 verwenden .Die gewaschenen Bakterien in 5 ml PIV – Puffer bei 4 ° C lagern.</p>
<p>Einbettung der Bakterien in Agaroseblöckchen</p>	<p>Die optische Dichte in geeigneten Schraubverschluss-Röhrchen mit je 4,0 ml vorgelegtem und zuvor sterilisiertem PIV - Puffer auf mindestens MC Farland 6,0 einstellen. 500µl dieser Bakteriensuspension mit 500µl 2% iger Low Melt- Point-Agarose in PIV – Puffer mischen und bei ca.50 ° C und ca. 800 UpM für ca. 10 min bis zum Pipettieren (am besten im vortemperierten Thermoblock) lagern. (Aliquotierte Agarose muss immer bei mindestens 95 ° C verflüssigt werden!) Je 5 Gelblöcke gießen und bei Kühlschranktemperatur polymerisieren lassen. Es werden pro Blöckchen ca. 100µl Bakterien –Agarose-Gemisch benötigt. Je 3 Gelblöcke in 5 ml PIV – Puffer bei 4 ° C lagern.</p>
<p>Isolierung der genomischen DNA</p>	<p><b><u>1.Lysis</u></b> 2 Gelblöcke in 1ml Lysis-Lösung ÜN bei 37°C im Schüttel-Wasserbad inkubieren.(Röhrchen nach erfolgter Lyse mit „L“ beschriften)</p>

	<p><b>2. Deproteinisierung</b>  Lysis-Lösung entfernen (Einmalpipette) und je 2 x mit je 5ml ES Lösung bei 37°C je 30 min inkubieren.  Danach Blöcke mit je 1ml ESP -Lösung für mindestens 17 h bei 50° C im Wasserbad inkubieren.  Blöcke 3x in je 14 ml TE-Puffer für 30 min. bei RT (auf dem Rocky-Schüttelgerät) waschen.  1 Block als Rückstellprobe in 5 ml PIV – Puffer bei 4°C lagern. (Röhrchen nach erfolgter Deproteinisierung mit „P“ beschriften)</p>
<p>Restriktionsverdau der DNA</p>	<p>Den anderen Block mit 1ml entsprechendem Enzym-Puffer 1x konz. für mindestens 30 min. bei RT äquilibrieren.  Puffer entfernen und dann erneut ca. 200 µl Puffer pro Probe zusetzen. An Restriktionsenzym sollen pro Block 100 U zugesetzt werden. Bitte Aktivität beachten!  Für MRSA: Sma 1 in Sure Cut Buffer 1x konz.  Für Enterobacter: Xba 1 in Buffer Tango 1 x konz.</p> <p>Der Restriktionsverdau erfolgt über Nacht bei 25°C im Thermoblock. Dann den Verdau durch Zugabe von 60 µl Ladepuffer stoppen. Gelblock mit einem Skalpell etwa mittig teilen.  Die optimale Größe sollte ungefähr 2 x 9 mm betragen.  Eine Hälfte des Blockes in ca. 5 ml PIV- Puffer bei 4 ° C rückstellen. (Röhrchen nach erfolgter Restriktion mit „R“ beschriften)</p>
<p>Auftrennung der verdauten DNA im gepulsten elektrischen Feld</p>	<p>Die andere Hälfte des Gelblockes mittels PFGE im Agarosegel auftrennen. Als Agarose wird ein Pulsed Field Certified Agarose (DNA grade) in 0,5 x konz. TBE-Puffer benutzt.</p> <p>Die halbierten Blöcke müssen nun mit Hilfe der Spatel in die Geltaschen transferiert werden. Die Gelstücke müssen in Laufrichtung direkt an der Gelwand anliegen.  Falls erforderlich muss zur Mitführung eines Größen-Standards eine Geltasche für den Ladder reserviert werden. Dessen Breite darf max. 9 mm betragen. (Falls erforderlich mit Skalpell zurechtschneiden.)  Alle Geltaschen (auch nicht beschickte!) müssen abschließend mit 1 % iger Low Melt –Agarose in 0,5 x TBE-Puffer versiegelt werden.</p> <p><u>Kammerbeschickung :</u>  2,5 l Laufpuffer (0,5 x TBE - Puffer) in die Kammer füllen, Gel vorsichtig einsetzen und die Pulsfeldgelelektrophoreseapparatur = CHEF- DR III Pulsed Field Electrophoresis System von BIO- RAD anstellen.  (Power on, Mini- Chiller anstellen, dann die Umwälzpumpe einschalten und Speed zwischen 60 und 70 einstellen.)</p>

	<p>Kühlung auf 14 °C stellen und Block 1 starten.  Es sind folgende Parameter programmiert:  Initial time 5,0 sec, final time 35 sec, run time 24 h,  Winkel 120 °, Strom 6 Volt/cm</p>
<p>Färbung in Ethidiumbromid-Färbelösung</p>	<p>Das Gel wird nach Ende der PFGE in einer Wanne in Ethidiumbromid-Färbelösung gegeben (hiefür Plexiglas – Schaufel verwenden) und ca.30 min bei RT auf dem Rocky - Schwenkgerät bei Einstellung 2 – 3 gefärbt. Mit aqua dest. bei gleichen Parametern entfärben und Flüssigkeit separat nach den Vorschriften der Betriebsanweisung für Ethidiumbromid entsorgen bzw. lagern.</p> <p>Wenn erforderlich kann beliebig oft ge- bzw. entfärbt werden. Das gefärbte PFGE-Gel in der Wanne lassen und mit Alufolie abdecken, um nachträgliche Verblässung der gefärbten Banden durch Lichteinwirkung zu vermeiden.</p>
<p>Dokumentation des Ergebnisses</p>	<p>Die Geldokumentation erfolgt am ChemiDoc XRS- Geldokumentations-System von Bio Rad. Dieses Gerät befindet sich in Zimmer EG 17 im Gebäude 44 – Medizinische Biochemie und Molekularbiologie. Um die Auflagefläche des Transilluminators vor Kontamination durch Ethidiumbromid zu schützen muss das Gel zuerst auf eine Folie aufgelegt werden, bevor es im Gerät ausgewertet und fotografiert wird. Dafür eignet sich am besten ein Vernichtungsbeutel von Sarstedt Art. -Nr.86.1197.</p> <p>Zur Speicherung der Bilder wird ein USB-Stick benötigt.</p> <p>Die Bedienung des ChemiDoc XRS- Geldokumentations- Systems von Bio Rad ist in einer gesonderten Arbeitsanleitung beschrieben.</p>

# Durchführungsprotokoll der spa-Typisierung

## Sequenzierung

### 1) DNA-Extraktion

DNA Extraktion mit "DNeasy blood and tissue Kit" (QIAGEN, # 69506)

### 2) PCR

Mastermix im Reinraum:

Ansatz für eine Probe:

- 10 µl H<sub>2</sub>O
- 12,5 µl PCR-Mix (VWR, # PEQL01-1599)
- 0,25 µl Primer forward No 20
- 0,25 µl Primer revers No 21
- + add 2,5 µl DNA (**Nicht** im Reinraum)

Primer:

NR.	Name	Sequenz	Erreger	Gen
20	spa1113f	TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C	Staph aureus	SA Protein A
21	spa1514r	CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT	Staph aureus	SA Protein A

Programm Thermocycler

95°C	7 min	} 30 cycles
95°C	30 s	
55°C	1 min	
72°C	3 min	
72°C	10 min	
10°C	∞	

### 3) Reinigung des Amplifikats

(Protokoll Beckman Coulter)

- Transfer 10µl of the PCR product to the sample plate
- Add 18µl magnetic beads, mix by pipetting, incubate for 5 minutes
- Put the sample plate on the magnetic plate, wait for 2 minutes, then discard the liquid
- wash 2 times with 200µl 70% ETOH (30sec)
- After removing ETOH (2<sup>nd</sup> wash), wait for 3 minutes until ETOH is evaporated
- take the sample plate from the magnetic base, dissolve the beads in 40µl water
- put the sample plate on the magnetic plate again, wait for 1min
- Transfer the liquid in 1,5ml tube (be sure that there are no beads in the sample)

#### 4) Cycle sequencing (Protokoll Beckman Coulter)

Do mastermix in clean room

- Important:** - 2 tests per sample, one with forward-Primer and one with reverse-Primer  
- Dissolve the Primer 1:10 with water (*spa*-Typing: 20f & 21r)

Reagents:

Komponenten	1x
DTCS Quick Start Mix	4µl
Primer	1µl
<b>Total</b>	<b>5µl</b>

→ 5µl Mix + 5µl Sample

PCR-Programm: Seq-Sequence

- 96°C     20sec
  - 50°C     20sec
  - 60°C     4min
  - 4°C       ∞
- } 30x

#### 5) Purification of the Sequencing PCR-Product

(Protokoll Beckman Coulter)

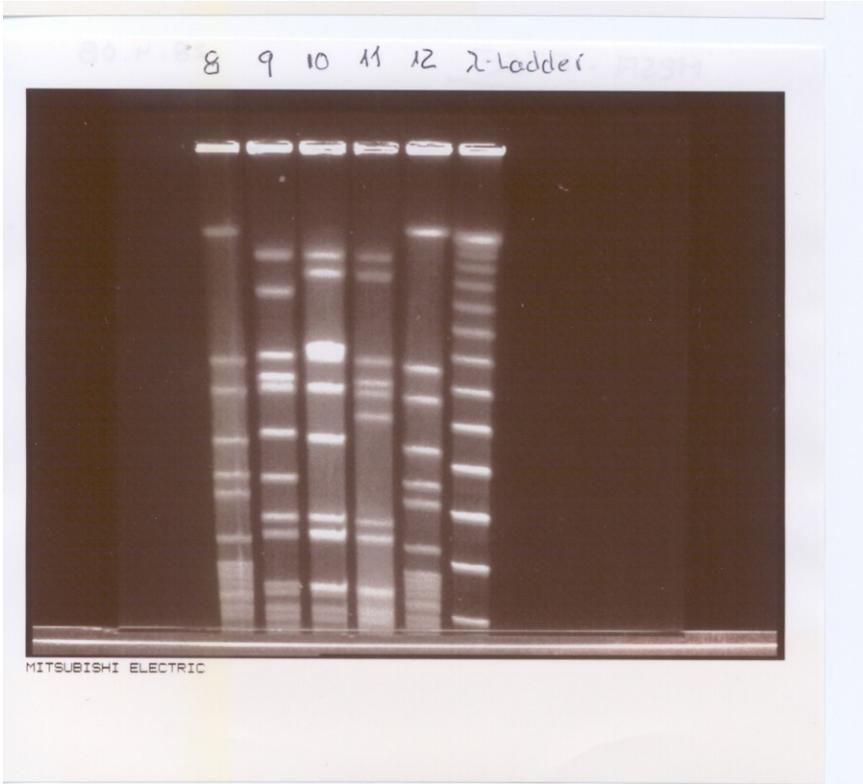
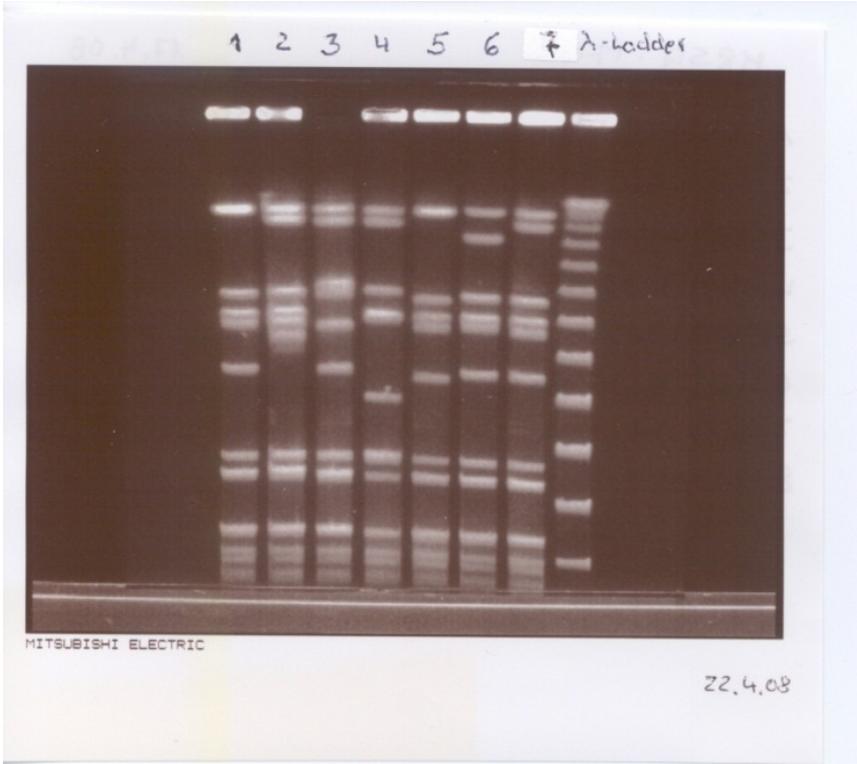
Take CleanSEQ Beads, 85% EtOH, gel cartridge, SLS and separation buffer out of the fridge to become room temperature.

- resuspend CleanSEQ Beads
- add 10µl Beads (take same tip for each sample, only change when touching the sample) and 42µl 85% Ethanol to the PCR-Product
- Mix by pipetting with multichannel pipet
- transfer the whole liquid to the sample plate
- put the sample plate on the magnetic plate, incubate for 3min
- discard the supernatant
- add 100µl 85% Ethanol, incubate for 30sec
- discard the supernatant
- take the Sample Plate from the magnetic plate (be sure that the magnetic plate stands far away).
- add 40µl SLS to each well
- Mix by pipetting
- Put a piece of paper to the magnetic plate and put your sample plate on it, so the beads will move to the bottom, incubate for 5min (maybe longer)
- while this 5min incubation time: fill the wells of the *Buffer Plate*  $\frac{3}{4}$  with Separation Buffer and put the gel cartridge into the machine
- seal the wells on your sample plate with 1 drop of mineral oil.

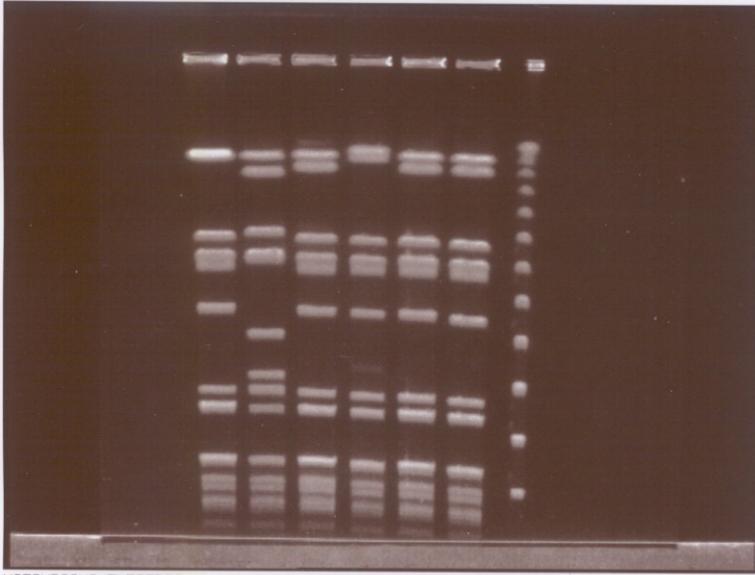
#### 6) Sequencing

Sequenzierung im „GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System“ von Beckman Coulter

# Fotografien der PFGE-Laufmuster

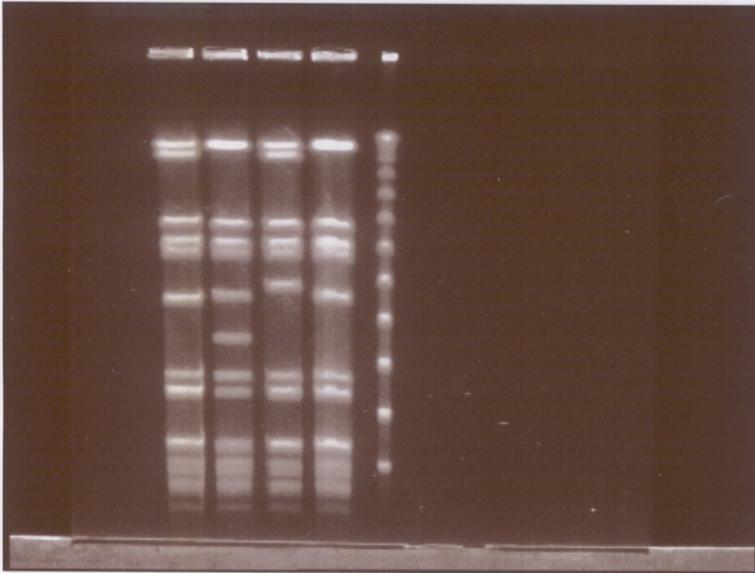


23 24 25 26 27 28  $\lambda$ -Ladder

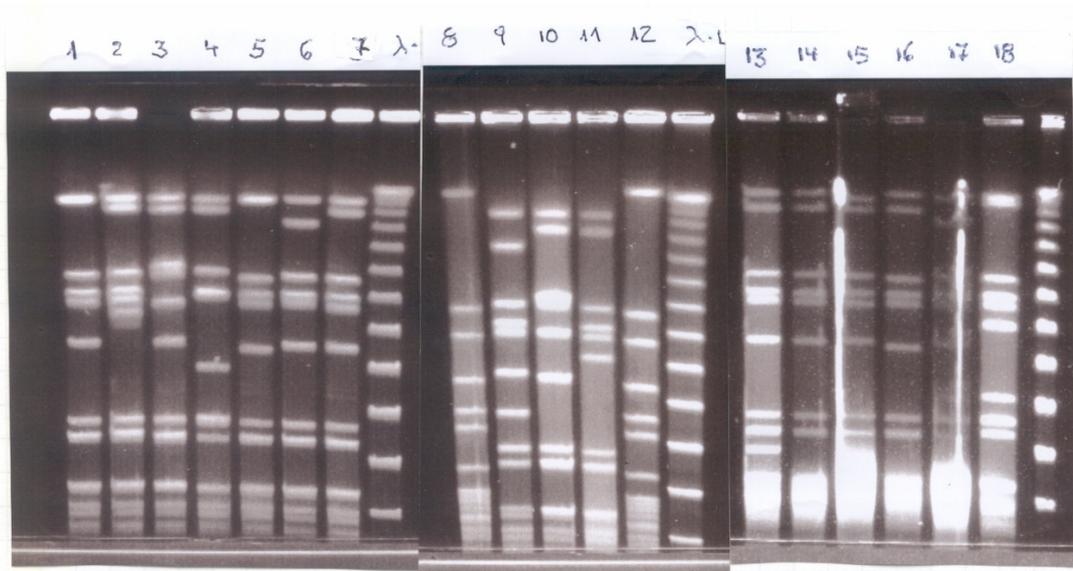


MITSUBISHI ELECTRIC

29 30 31 32  $\lambda$ -Ladder



MITSUBISHI ELECTRIC



# Ergebnislisten der spa-Typisierung

## Marked Strains

Isolate ID	Spa-type Comment	Spa-type MLST	Repeat succession (Ridom)	Spa-type ID
H12_5BachRosa_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
H02_97WGHWB18O_spa-1113f			26-17-20-17	t1007
H01_274322-2-08_spa-1113f			26-17-20	t6AD
G12_4NBE26_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
G03_WB17H_spa-1113f			26-17-20-17-12-17	t837
G02_97WB137_spa-1113f			26-17-20-17	t1007
G01_2717Lalste_spa-1113f			26-17-20-17	t1007
F12_4NB127aFuss_spa-1113f			26-17-20-17-12	t504
F03_EI16_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
F02_97WB12_spa-1113f			26-17-20-17-12	t504
E12_2WB414_spa-1113f			26-23-17-34-17-20-17-12-17	t067
E04_StJoWB310DEPEG_spa-1113f		ST-5	26-23-17-34-17-20-17-17-16	t105
E03_AB424_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
E02_97App1_spa-1113f			26-17	t2379
E01_2431_spa-1113f			26	t458
D12_2WB1-21_spa-1113f			26-17-20-17-12	t504
D08_WB110Hsupra_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
D04_StJoWB282PEG_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
D03_ABI112860_spa-1113f			26-23-17-34-17-20-17	t1340
D02_97III44_spa-1113f			26-17	t2379
D01_2417Lelste_spa-1113f			09-02	t918

03-Mar-2008 16:49, Ridom StaphType 1.5.6, www.ridom.de

Page 1 of 2

## Marked Strains

Isolate ID	Spa-type Comment	Spa-type MLST	Repeat succession (Ridom)	Spa-type ID
C06_8169_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
C03_9968_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
C01_6186_spa-1113f			26-17-20-17-12-17	t837
B04_StJoWB211Rsuprapubisch_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
B03_9923_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
B02_818_spa-1113f			26-17	t2379
B01_6185_spa-1113f			26-17-20-17-12	t504
A04_StJoWB26B_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003
A03_97WGHWB213_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (prototype), EMRSA-3, New York clone, Japan clone, Pediatric, USA100 ORSA II, USA800 ORSA IV, ST 5 ORSA I	ST-5, ST-231	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	t002
A02_2751KIE_spa-1113f			26-23	t2235
A01_5HrMetz_spa-1113f	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone	ST-5, ST-225	26-17-20-17-12-17-17-16	t003

32 Strains from marking list.

03-Mar-2008 16:49, Ridom StaphType 1.5.6, www.ridom.de

Page 2 of 2

## SPSS-Output der statistisch geprüften Merkmale

### Einfaktorielle Varianzanalyse bezüglich des Merkmals Alter der Bewohner

Descriptives ALTER								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Heimprävalenz 0-6%	32	85,19	6,916	1,223	82,69	87,68	72	96
Heimprävalenz 7-12%	37	82,03	11,099	1,825	78,33	85,73	50	103
Heimprävalenz 13-18%	43	77,51	11,861	1,809	73,86	81,16	52	97
<b>Total</b>	<b>112</b>	<b>81,20</b>	<b>10,799</b>	<b>1,020</b>	<b>79,17</b>	<b>83,22</b>	<b>50</b>	<b>103</b>

ANOVA ALTER					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	1119,086	2	559,543	5,157	,007
<b>Within Groups</b>	11826,592	109	108,501		
<b>Total</b>	12945,679	111			

### Einfaktorielle Varianzanalyse bezüglich des Merkmals Dauer des Heimaufenthalts

Descriptives Heimbewohner seit Monaten								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Heimprävalenz 0-6%	31	44,94	37,345	6,707	31,24	58,63	1	135
Heimprävalenz 7-12%	34	53,94	48,917	8,389	36,87	71,01	5	235
Heimprävalenz 13-18%	43	45,00	48,421	7,384	30,10	59,90	5	271
<b>Total</b>	<b>108</b>	<b>47,80</b>	<b>45,462</b>	<b>4,375</b>	<b>39,12</b>	<b>56,47</b>	<b>1</b>	<b>271</b>

ANOVA					
Heimbewohner seit Monaten					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1873,765	2	936,883	,449	,640
Within Groups	219277,753	105	2088,360		
Total	221151,519	107			

## Kontingenztafel und Chi-Quadrat-Test des Merkmals KH-Aufenthalt/kein KH-Aufenthalt

KEINKHA * HEIMPRÄV Crosstabulation					
Count					
		HEIMPRÄV			Total
		Heimprävalenz 0-6%	Heimprävalenz 7-12%	Heimprävalenz 13-18%	
KEINKHA	Kein KH-Aufenthalt	9	9	20	38
	KH-Aufenthalt	24	28	24	76
Total		33	37	44	114

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4,806(a)	2	,090
Likelihood Ratio	4,765	2	,092
Linear-by-Linear Association	3,159	1	,076
N of Valid Cases	114		

a 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 11,00.

## Kontingenztafel und Chi-Quadrat-Test des Merkmals Häufigkeit eines KH-Aufenthalts

KH-Aufenthalte gesamt * HEIMPRÄV Crosstabulation					
Count					
		HEIMPRÄV			Total
		Heimprävalenz 0-6%	Heimprävalenz 7-12%	Heimprävalenz 13-18%	
KH-Aufenthalte gesamt	kein KH Aufenthalt	9	9	23	41
	KH Aufenthalt	18	23	13	54
	zwei Aufenthalte	5	5	7	17
	drei und mehr Aufenthalte			1	1
Total		32	37	44	113

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
<b>Pearson Chi-Square</b>	11,944(a)	6	,063
<b>Likelihood Ratio</b>	12,453	6	,053
<b>Linear-by-Linear Association</b>	1,525	1	,217
<b>N of Valid Cases</b>	113		

a 4 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,28.

## Einfaktorielle Varianzanalyse des Merkmals **gesamte Aufenthaltsdauer im Krankenhaus (in Tagen)**

Descriptives								
KH-Tage gesamt letzte 12 Monate								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<b>Heimprävalenz 0-6%</b>	32	12,22	13,254	2,343	7,44	17,00	0	50
<b>Heimprävalenz 7-12%</b>	37	14,68	17,155	2,820	8,96	20,40	0	63
<b>Heimprävalenz 13-18%</b>	44	9,95	14,522	2,189	5,54	14,37	0	58
<b>Total</b>	113	12,14	15,106	1,421	9,33	14,96	0	63

ANOVA					
KH-Tage gesamt letzte 12 Monate					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	448,249	2	224,124	,982	,378
<b>Within Groups</b>	25107,486	110	228,250		
<b>Total</b>	25555,735	112			

## Einfaktorielle Varianzanalyse des Merkmals Pflegestufe

Descriptives PFLEGEST								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Heimprävalenz 0-6%	33	2,24	1,032	,180	1,88	2,61	1	4
Heimprävalenz 7-12%	37	1,95	,941	,155	1,63	2,26	1	4
Heimprävalenz 13-18%	43	1,88	,931	,142	1,60	2,17	1	4
<b>Total</b>	113	2,01	,968	,091	1,83	2,19	1	4

ANOVA PFLEGEST					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	2,620	2	1,310	1,408	,249
<b>Within Groups</b>	102,371	110	,931		
<b>Total</b>	104,991	112			

## Kontingenztafel und Chi-Quadrat-Test des Merkmals Diabetes mellitus

HEIMPRÄV * DIABETES Crosstabulation Count				
		DIABETES		Total
		Diabestes besteht	Diabetes besteht nicht	
HEIMPRÄV	Heimprävalenz 0-6%	12	21	33
	Heimprävalenz 7-12%	10	27	37
	Heimprävalenz 13-18%	10	34	44
Total		32	82	114

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
<b>Pearson Chi-Square</b>	1,766(a)	2	,413
<b>Likelihood Ratio</b>	1,737	2	,420
<b>Linear-by-Linear Association</b>	1,673	1	,196
<b>N of Valid Cases</b>	114		

a 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,26.

## Kontingenztafel und Chi-Quadrat-Test des Merkmals Harnkatheter

**HEIMPRÄV \* HARNKATH Crosstabulation**  
Count

		HARNKATH		Total
		Harnkatheter liegt	Harnkatheter liegt nicht	
HEIMPRÄV	Heimprävalenz 0-6%	6	27	33
	Heimprävalenz 7-12%	1	36	37
	Heimprävalenz 13-18%	9	35	44
<b>Total</b>		16	98	114

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5,911(a)	2	,052
Likelihood Ratio	7,405	2	,025
Linear-by-Linear Association	,229	1	,632
N of Valid Cases	114		

a 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,63.

## Kontingenztafel des Merkmals PEG-Sonde

**PEG \* HEIMPRÄV Crosstabulation**

			HEIMPRÄV			Total
			Heimprävalenz 0-6%	Heimprävalenz 7-12%	Heimprävalenz 13-18%	
PEG	Sonde liegt	Count	4	2	7	13
		Expected Count	3,8	4,2	5,0	13,0
	Sonde liegt nicht	Count	29	35	37	101
		Expected Count	29,2	32,8	39,0	101,0
<b>Total</b>		Count	33	37	44	114
		Expected Count	33,0	37,0	44,0	114,0

## Kontingenztafel des Merkmals offene Wunde

**WUNDEN \* HEIMPRÄV Crosstabulation**

			HEIMPRÄV			Total
			Heimprävalenz 0-6%	Heimprävalenz 7-12%	Heimprävalenz 13-18%	
WUNDEN	Offene Wunden	Count	2	0	3	5
		Expected Count	1,4	1,6	1,9	5,0
	Keine offenen Wunden	Count	31	37	41	109
		Expected Count	31,6	35,4	42,1	109,0
Total		Count	33	37	44	114
		Expected Count	33,0	37,0	44,0	114,0

## Kontingenztafel des Merkmals Decubitus

**DEKUBITU \* HEIMPRÄV Crosstabulation**

			HEIMPRÄV			Total
			Heimprävalenz 0-6%	Heimprävalenz 7-12%	Heimprävalenz 13-18%	
DEKUBITU	Dekubitus besteht	Count	3	0	3	6
		Expected Count	1,7	1,9	2,3	6,0
	Dekubitus besteht nicht	Count	30	37	41	108
		Expected Count	31,3	35,1	41,7	108,0
Total		Count	33	37	44	114
		Expected Count	33,0	37,0	44,0	114,0

## Kontingenztafel und Chi-Quadrat-Test des Merkmals Heimgröße

**HEIMGRGR \* HEIMPRÄV Crosstabulation**

Count

		HEIMPRÄV			Total
		Heimprävalenz 0-6%	Heimprävalenz 7-12%	Heimprävalenz 13-18%	
HEIMGRGR	unter 120 Bewohnern	11	4	24	39
	über/gleich 120 Bewohner	22	32	20	74
Total		33	36	44	113

**Chi-Square Tests**

	<b>Value</b>	<b>df</b>	<b>Asymp. Sig. (2-sided)</b>
<b>Pearson Chi-Square</b>	16,556(a)	2	,000
<b>Likelihood Ratio</b>	17,872	2	,000
<b>Linear-by-Linear Association</b>	4,892	1	,027
<b>N of Valid Cases</b>	113		

a 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 11,39.

## **8 Danksagung**

Ich danke den an der Studie beteiligten Heimbewohnern und den Mitarbeitern der Pflegeeinrichtungen für ihre Teilnahme und den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums des Saarlandes für ihre Hilfestellung im Labor.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Mathias Herrmann, Herrn Prof. Dr. med. Freiherr von Müller und Herrn Dr. med. Udo Geipel für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung während des Projektes.