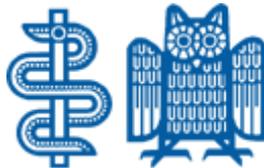


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institute für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ. – Prof. Dr. med. M. Herrmann



**Mikroarray-basierte Charakterisierung von
Staphylococcus aureus Isolaten in Homburg
(Deutschland) und Ifakara (Tansania)**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2015

vorgelegt von Laura Karolin Stichter, geb. Wende

geboren am 12.06.1987 in Saarbrücken

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	1
2 Zusammenfassung	1
2.1 Deutsche Fassung.....	1
2.2 Abstract	2
3 Einleitung	3
3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
3.2 Resistenzfaktoren	5
3.3 Virulenzfaktoren.....	7
3.4 Typisierungsmethoden	11
3.5 Geographische Unterschiede (Deutschland/Afrika)	15
3.6 Zielsetzung	17
4 Material und Methoden	18
4.1 Probanden	18
4.2 Patienten	18
4.3 Probandendaten/Patientendaten	19
4.4 Identifikation	20
4.5 Antibiotikaresistenztestung	20
4.6 Kulturelle Anzucht.....	21
4.7 DNA-Aufreinigung.....	21
4.8 Messung der DNA-Konzentration	22
4.9 DNA-Markierung (PCR)	22
4.10 DNA-Hybridisierung Mikroarray	23
4.11 Spa-Typisierung	24
4.12 Statistische Methoden und Auswertung.....	25
4.13 Materialnachweis	27
5 Ergebnisse	29
5.1 Studienteilnehmer.....	29
5.2 Genübersicht Mikroarray	29
5.2.1 Resistenzgene	32

5.2.2	Virulenzgene.....	33
5.2.3	Accessory Gene Regulator-Typen.....	35
5.2.4	Kapsel- und Biofilmgene.....	36
5.2.5	Adhäsionsgene.....	37
5.2.6	Superantigen- und Enterotoxin-ähnliche Gene.....	38
5.3	Clonal Complex-Analyse.....	39
5.3.1	Genrepertoire in den klonalen Komplexen.....	43
5.3.2	Hierarchische Clusteranalyse - CC5 und CC15.....	53
5.4	Hierarchische Clusteranalyse - global.....	55
5.5	Hierarchische Clusteranalyse - länderspezifisch.....	57
5.6	Spa-Typisierung Homburg.....	59
6	Diskussion.....	62
7	Anhang.....	71
8	Literaturverzeichnis.....	84
9	Publikation.....	95
10	Danksagung.....	97
11	Lebenslauf.....	98

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillatum
AIDS	Erworbenes Immundefizienz Syndrom
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CA	community-acquired
CC	klonaler Komplex
CRF	Case Report Forum (Fragebogen)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d-UTP	2'-Deoxyuridin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ExoSAP	Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase
egc	Enterotoxin Gencluster
g	Erdbeschleunigung (Zentrifuge) bzw. Gramm
HA	healthcare-acquired
H ₂ O	Wasser
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HS	Homburg/Saar
IBMT	Institut für biomedizinische Technik
IT	Ifakara/Tansania
IVDA	intravenöser Drogenabusus
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of flight
MAP	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein
MGE	mobile genetische Elemente
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
MLST	Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
rpm	revolutions per minute (Thermorüttler)
sma1	erstes aus <i>Serratia marcescens</i> isoliertes Restriktionsenzym
SNP	single nucleotide polymorphism
Spa	<i>Staphylokokken</i> Protein A
ST	Sequenztyp
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TSA	Trypticinase Soy Agar
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
V	Volt
VISA	Vancomycin-intermediär resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
µl	Mikroliter

2 Zusammenfassung

2.1 Deutsche Fassung

Staphylococcus aureus ist ein humanpathogenes Bakterium mit weltweiter Verbreitung und der Fähigkeit der Kolonisation und der Invasion. Im Rahmen des *african-german-staphnet* Konsortiums wurden in einer prospektiven multizentrischen Studie kolonisierende und invasive *Staphylococcus aureus* Isolate in Homburg/Deutschland und Ifakara/Tansania gesammelt und mittels Mikroarray-Technologie (Identibac®) untersucht.

Anhand der ermittelten komplexen genetischen Information wurden unter anderem Unterschiede in den Resistenzgenen untersucht. Neben der erhöhten genotypischen Penicillinresistenz (*blaZ* in 95% positiv) fiel eine erhöhte genotypische Tetrazyklinresistenz (*tetK* in 28% positiv) in Tansania im Vergleich zu deutschen Isolaten auf. Der überwiegende Teil der *S. aureus* Isolate war Methicillin-sensibel (*mecA* in 2% positiv).

Ein weiterer Aspekt war die Untersuchung der Virulenzgene. Mit Ausnahme von Exfoliativtoxin A mit höherer Prävalenz in Tansania, zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Verteilung der klassischen Toxine, wie Entero- und Exfoliativtoxine, zwischen den beiden geografischen Regionen. Bemerkenswert war die Prävalenz der PVL-positiven Isolate in Tansania im Vergleich zu den deutschen Isolaten.

Anhand der Verteilung der klonalen Komplexe konnten transkontinentale phylogenetische Unterschiede nachgewiesen werden. In Homburg fanden sich am häufigsten CC7, CC5 und CC45. In Tansania dominierten CC121, CC15 und CC5, wobei sich dort besonders die invasiven Isolate aus CC121 und ST152 rekrutierten. In den nasalen Isolaten herrschten die CC15, CC8 und CC45 vor. Die Verteilung der Isolate nach ihrer Lokalisation, nasal oder invasiv, war in Deutschland ausgeglichen, lediglich CC101 war häufiger in kolonisierenden Isolaten zu finden.

2.2 Abstract

Staphylococcus aureus is a worldwide human pathogen associated with colonization and also severe invasive infections. Within the *african-german-staphnet* consortium nasal and invasive *Staphylococcus aureus* isolates from Homburg/Germany and Ifakara/Tanzania were collected and analyzed with microarray technology (Identibac®) in a prospective multicenter study.

The comprehensive genetic data were used to analyze the resistance gene repertoire. Apart from the increased genotypic penicillin resistance (*blaZ* in 95% positive) there was an increased genotypic tetracycline resistance (*tetK* in 28% positive) in Tanzania in contrast to German isolates. Most of the isolates were methicillin sensitive (*mecA* in 2% positive).

Analyzing the virulence gene repertoire was a further aspect. No statistical differences were detected between both geographic regions in the distribution of the classical toxins like entero- or exfoliative toxins, except for exfoliative toxin A with higher prevalence in Tanzania. The prevalence of PVL positive isolates was significantly higher in Tanzania as compared to German isolates.

Transcontinental phylogenetic differences were revealed based on the distribution of the clonal complexes. The most common CCs in Homburg were CC7, CC5 and CC45. In Tanzania high abundance of CC121, CC15 and CC5 was detected whereas the invasive isolates were dominated by CC121 and ST152. The predominant CCs in nasal isolates were CC15, CC8 and CC45. In Germany the CC distribution was similar between nasal and invasive isolates, except for CC101 which was more abundant in isolates of nasal origin.

3 Einleitung

3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind grampositive Kugelbakterien der Familie der *Staphylococcaceae*, welche sich in allen Ebenen des Raumes teilen und somit zu traubenförmigen Kolonien anordnen. Die fakultativ anaeroben Keime sind unbeweglich, katalasepositiv und bilden keine Sporen [Schleifer and Bell, 2009]. Die größte humanpathogene Bedeutung kommt der koagulasepositiven *Staphylococcus aureus* Spezies zu. Sie bildet auf bluthaltigen Nährböden porzellanweiße bis elfenbeinfarbige Kolonien, welche aufgrund der β -Hämolyse von einer klaren Hämolysezone umgeben sind.

S. aureus kolonisiert die Haut und Schleimhäute von Säugern. Eine Nische bildet insbesondere der Nasenvorhof von Erwachsenen [Aly and Levit, 1987; Hoefnagels-Schuermans et al., 1999]. Die Prävalenz der gesunden Träger in der Bevölkerung wird auf 25 - 30% geschätzt [van Belkum et al., 2009; Wertheim et al., 2005]. Der Nasenvorhof gilt als häufigster Kolonisierungsort, jedoch gibt es auch extranasale Stellen, wie die Haut, der Pharynx und das Perineum, welche gehäuft mit *S. aureus* besiedelt sind [Armstrong-Esther, 1976; Ridley, 1959; Wertheim et al., 2005; Williams, 1963]. Der Anteil an Krankheitsträgern variiert zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen mit höheren Raten in der weißen Bevölkerung [Cole et al., 2001; Williams, 1963] und mit der Geschlechtszugehörigkeit (Männer häufiger) [Eriksen et al., 1995; Herwaldt et al., 2004; Williams, 1963] und dem Alter [Armstrong-Esther, 1976; Parnaby et al., 1996; Peacock et al., 2003].

Jedoch kann *S. aureus* auch eine Vielzahl invasiver, z. T. lebensbedrohlicher Erkrankungen verursachen, z. B. Haut- und Weichteilinfektionen (Furunkel, Follikulitis), Blutstrominfektionen, infektiöse Endokarditiden, Pneumonien und Osteomyelitiden.

Ferner spielen toxinbedingte Erkrankungen, wie das Toxic-Shock-Syndrom, das Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrom oder Lebensmittelvergiftungen eine Rolle [Que and Moreillon, 2009].

Unter bestimmten Voraussetzungen sind die Kolonisationsraten erhöht, wie z. B. bei Diabetes mellitus Typ I [Tuazon et al., 1975], AIDS [Weinke et al., 1992], IVDA [Tuazon and Sheagren, 1974], Hämodialyse [Yu et al., 1986], chirurgischen Eingriffen [Kluytmans et al., 1995; Weinstein, 1959] sowie qualitativen und quantitativen Defekten der Leukozyten [Que and Moreillon, 2009]. Auch adipöse Patienten und solche, die einen Schlaganfall erlitten haben, [Herwaldt et al., 2004] gelten als gefährdet für höhere Kolonisationsraten. Obwohl die Kolonisierung oft asymptomatisch verläuft, haben nasale Träger ein erhöhtes Risiko für Infektionen [Cavalcanti et al., 2005; Kluytmans et al., 1997; von Eiff et al., 2001]. Jedoch haben sog. Nichtcarrier bei exogenen Bakteriämien mit *S. aureus* eine vierfach erhöhte Mortalität im Vergleich zu den Carriern [Wertheim et al., 2004].

Das zirkulär angeordnete Genom enthält etwa 2,8 Millionen Basenpaare. Etwa 80% dieser DNA wird gebildet vom sog. *core-genome* mit den *housekeeping* Genen. Der restliche Anteil entfällt auf das *accessory genome* mit mobilen DNA-Elementen (MGE), die viele Pathogenitätsfaktoren und Resistenzfaktoren tragen [Que and Moreillon, 2009]. Die Gene für Virulenz- und Resistenzfaktoren befinden sich sowohl auf dem Chromosom als auch auf extrachromosomalen Elementen [Novick, 1990].

Zur Untersuchung der Phylogenie von *S. aureus* Isolaten, welche äußerst klonal sind, ist die Einteilung in klonale Komplexe (CC), basierend auf der Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST), eine bewährte Methode. Anhand der Sequenzen der housekeeping Gene können die Isolate zu Sequenztypen (ST) zugeordnet werden. Nahverwandte Sequenztypen werden einem klonalen Komplex mit dem jeweiligen Stammesvater zugeordnet. In den CC sind somit Abkömmlinge eines Klons zusammengefasst, die sich über eine gewisse Zeit entwickelt haben [Enright et al., 2000]. Eine direkte Aussage über die Fähigkeit zur Invasion oder

Kolonisation kann anhand der CC nicht getroffen werden [Feil et al., 2003]. Des Weiteren können sich die einzelnen Abkömmlinge in ihrer Ausstattung mit Resistenz- und Virulenzgenen unterscheiden. Diese Gene werden größtenteils über mobile Elemente vermittelt, wobei der Zugewinn als auch der Verlust dieser Elemente zu rasch geschieht, um eine Veränderung des stabilen *core-genome* zu bewirken [Feil et al., 2003].

3.2 Resistenzfaktoren

Im Jahre 1942 sind die ersten penicillinresistenten *S. aureus* Stämme entdeckt worden [Rammelkamp and Maxon, 1942]. Schon Ende der 1960er Jahre waren mehr als 80% der Staphylokokkenisolate, ob krankenhaussassoziiert oder communityassoziiert, resistent gegen **Penicillin**. Aktuell produzieren mehr als 90% der Isolate Penicillinasen [Lowy, 2003]. Erste methicillinresistente *S. aureus* - Stämme tauchen schon kurz nach der Einführung der Medikamente im Jahre 1961 auf [Jevons, 1961]. Die Zahl der resistenten *S. aureus* steigt seitdem immer weiter an. Auch Resistenzen gegen Reservetherapeutika sind keine Seltenheit mehr.

Staphylococcus aureus bedient sich den allgemeinen Resistenzmechanismen, wie Veränderung der Zielstruktur, veränderter Zugang zu den Zielstrukturen und enzymatische Inaktivierung der Antibiotika, wie sie bei Bakterien bekannt sind [Bodmann K.-F., 2010]. Sie bilden β -Lactamasen, die die **β -Lactamantibiotika** spalten und somit die Transpeptidasen (Penicillin-bindenden-Proteine) wieder frei sind und die Zellwand weiter vernetzt werden kann. Die genetische Information zur β -Lactamaseresistenz bei *S. aureus* liegt meist plasmidgebunden im *blaZ*-Gen. Induziert und begleitet wird *blaZ* von den Regulationsgenen *blaR1* als Membranrezeptor und *blaI* als Genrepressor.

Bei der Methicillinresistenz wird eine neue Transpeptidase gebildet, *PBP2A*, die für die β -Lactamantibiotika nicht zugänglich ist. Methicillin-resistente *S. aureus* tragen die sog. *staphylococcal chromosome cassette (SCC) mec*, ein exogener Teil der DNA mit einer Größe zwischen 21 und 67kb [Hiramatsu et al., 2001]. *SCCmec*

besteht aus den Rekombinasen *ccrA* und *ccrB*, welche zur Mobilisierung (Integration, Exzision) des Elementes beitragen und dem die Resistenz vermittelten *mecA*-Gen. *MecA* kodiert für das oben erwähnte *PBP2A*, welches für die Resistenz verantwortlich ist. Begleitet wird *mecA*, analog zu *bla*, von den Regulatoren *mecR1* und *mecI*. Je nach Struktur und Größe der Rekombinasen und des *mecA*-Gens existieren verschiedene *SCCmec*-Typen, die sich auch verschiedenen MRSA zuordnen lassen. Beispielsweise sind sog. Healthcare-assoziierte MRSA (HA-MRSA) klonal, tragen große *SCCmec*-Elemente mit vielen Resistenzgenen und sind schwer zu mobilisieren. Community-assoziierte MRSA (CA-MRSA) sind in der Regel weniger klonal und tragen kleinere *SCCmec*-Elemente, die leichter zu mobilisieren sind [Que and Moreillon, 2009]. Liegt eine Resistenz gegen Methicillin vor, so besteht gleichermaßen eine Resistenz gegen die anderen β -Lactame, wie Cephalosporine.

Resistenzen gegen **Makrolide, Lincosamide und Streptogramine (MLS)** entstehen durch posttranskriptionelle Methylierungen, wie zum Beispiel die Ribosomenmodifikation durch *erm* (Erythromycin Methylase), was die Änderung der Zielstruktur bedingt [Weisblum, 1995]. Die Produktion durch *erm* ist induzierbar und oftmals durch Medikamente getriggert. Es kommt dabei häufig zu Kreuzresistenzen gegen andere Mitglieder dieser Gruppe, wie zum Beispiel Ketolide und Lincosamide (induzierbare Clindamycinresistenz), was diagnostisch über den D-Diffusionstest messbar ist. Aktiver Efflux der Makrolide wird über die *msrA*- und *mefA*-Gene vermittelt [Leclercq, 2002; Ross et al., 1995; Ross et al., 1990].

Gegen **Tetrazykline** vermittelte Resistenzen sind in *tetK*, *tetM*, *tetL* und *tetO* kodiert und entstehen durch Effluxpumpen, RNA-Modifikationen und verschiedene Ribosom-schützende Proteine [Roberts, 1996].

Die **Vancomycinresistenz**, ursprünglich bei Enterokokken entdeckt, ist die Folge zweier unterschiedlicher Mechanismen: einerseits existieren chromosomal vermittelte intermediär resistente *S. aureus*, VISA, die aufgrund einer Änderung

der Peptidoglycan-Biosynthese eine andere Konfiguration der Zellwand haben und somit Vancomycin von freien D-Ala-Enden abgefangen wird, andererseits auf einer über Konjugation des *vanA*-Operons vermittelten kompletten Resistenz, VRSA, die in einer Änderung der Aminosäuresequenz, aus D-Ala-D-Ala wurde D-Ser/Lac-D-Ala, resultiert, sodass die Glycopeptide keinen Angriffsort mehr haben [Lowy, 2003]. Bis zum aktuellen Zeitpunkt sind jedoch nur wenige klinische Fälle mit VRSA beschrieben [Rossi et al., 2014].

Eine **Aminoglycosidresistenz** entsteht aufgrund der Modifikation bestimmter Enzyme, die zur Inaktivierung des Medikaments führt. Vermittelt werden die Mechanismen über Acetyltransferasen (AAC), Phosphotransferasen (APH), Nucleotidyltransferasen (ANTS) und Adenyltransferasen (AAD). Das häufigste Aminoglycosid-modifizierende Enzym (AME) ist AAC-APH, kodiert im *aac-aph*-Gen, welches die Resistenz gegen Gentamicin und Tobramycin vermittelt [Liakopoulos et al., 2011; Schmitz et al., 1999].

Nach Einführen der **Fluorchinolone** 1980 sind rasch Resistenzen entstanden, jedoch vermehrt unter MRSA als unter MSSA. Die Grundlagen der Resistenz sind spontane Mutationen der Topoisomerase und Induktion einer Effluxpumpe [Lowy, 2003]. Mutmaßlich mitverantwortlich für eine Kolonisation mit resistenten Mutanten sind untertherapeutische Konzentrationen der Medikamente, die einen Selektionsdruck auf die Bakterien ausüben [Hooper, 2002].

3.3 Virulenzfaktoren

Staphylococcus aureus ist in der Lage viele Oberflächenproteine und weitere Proteine, die zur Wirtkolonisation und zu Erkrankungen beitragen, zu produzieren. Die Regulation dieser Bildung geschieht größtenteils über das sog. agr (accessory gene regulator)-System, ein quorum-sensing-Regulationssystem, welches die Genexpression anhand der Bakteriendichte steuert. Bei niedriger Zelldichte in der exponentiellen Wachstumsphase werden Oberflächenproteine, die die Kolonisierung erleichtern, in der postexponentiellen stationären Wachstumsphase

mit hoher Zelldichte werden Exoproteine, die die Ausbreitung im Organismus erleichtern, synthetisiert [Novick, 2003; Novick et al., 1993]. Es existieren vier Typen des agr-Systems, I - IV. Auch weitere Regulationsmechanismen, wie DNA-bindende Proteine und *small regulatory RNA* sind bekannt, welche u. a. auch abhängig von den Umgebungsbedingungen teilweise direkt, aber auch indirekt über das agr-System, die Bildung der Virulenzfaktoren kontrollieren [Novick, 2003].

Zytotoxine

Es existieren Zytotoxine, die in der Zielzelle Poren bilden können und mit einer Proinflammation zu einer Sepsis führen können. Zu diesen Zytotoxinen zählen auch Hämolyse, bekannt sind die chromosomal gelegenen Hämolyse α , β , γ und δ . Sie sorgen für die Lyse der Erythrozyten sowie weiterer eukaryoter Zellen. Leukozidine lysieren Leukozyten, das Panton-Valentine Leukocidin (PVL) ist ein leukozytolytisches Toxin, bestehend aus zwei Untereinheiten lukS-PV und lukF-PV [Lina et al., 1999]. Es ist ein potentes Toxin mit spezifischem Tropismus für humane neutrophile Granulozyten mit der Fähigkeit zur Hautnekrose, Lyse der Granulozyten und verstärkten Adhärenz der Keime an die extrazelluläre Matrix [Löffler et al., 2010]. Klinisch präsentieren sich PVL-tragende *S. aureus* besonders als Auslöser von Haut- und Weichteilinfektionen und hämorrhagischen Pneumonien [Gillet et al., 2002; Lina et al., 1999]. Die Gene für PVL liegen auf einem mobilen Phagen (ϕ SLt), was den Transfer zwischen verschiedenen Stämmen ermöglicht. Es steht hoch im Verdacht, besonders zur Ausbreitung neuer MRSA-Klone beizutragen [Lina et al., 1999] und ist somit mindestens ein relevanter Faktor, der verantwortlich für die unterschiedliche klinische Präsentation der CA-MRSA zu sein scheint [Herrmann et al., 2013].

Proinflammatorische Toxine

Proinflammatorische Toxine fungieren als Superantigene oder Superantigen-ähnliche Toxine und können durch die massive Freisetzung u. a. von Zytokinen zu

einer überschwemmenden Immunantwort führen, welche in schockähnlichen Zuständen enden kann. Zum Einen kann es durch das toxic shock syndrom-Toxin (TSST-1) zu einem Toxic-Shock-Syndrom kommen. Bis zu 20% der Isolate enthalten TSST-1 [Becker et al., 2003], jedoch tritt die Erkrankung viel seltener auf [McCormick et al., 2001]. Zum Anderen existieren 15 hitzestabile Enterotoxine, die zu einer Lebensmittelvergiftung mit typischen gastrointestinalen Symptomen, wie Übelkeit, Erbrechen, Bauchkrämpfe und Durchfall führen kann [Dinges et al., 2000]. Am häufigsten sind die Enterotoxine A, B und C. Durch die Exfoliativtoxine A und B kommt es zur Epidermolysen, welche sich klinisch als Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrom äußert. Die Exfoliativtoxine haben einen direkten Effekt auf das Stratum granulosum, wo sie Desmoglein-1 hydrolysieren [Ladhani, 2003].

Katabole Enzyme

Viele Enzyme, wie Proteasen, Lipasen, Hyaluronidasen, Nucleasen sind zur Ernährung, Ausbreitung und Gewebszerstörung zuständig. Koagulasen starten die Gerinnung. Sie eignen sich auch diagnostisch zur Diskriminierung der einzelnen Staphylokokken zu *Staphylococcus aureus*. Die Staphylokinase ist ein Plasminogenaktivator, der zum Überleben im Nasenvorhof bei nasalen Trägern beiträgt [Wertheim et al., 2005]. Kodiert ist das 15,5kDa-Protein im *sak*-Gen [Bokarewa et al., 2006; Ohlenschlager et al., 1998]. Durch Bindung an Defensine schützt Staphylokinase vor einer Defensin-vermittelten Bakteriolyse [Bokarewa et al., 2006]. Das Chemotaxis-inhibierende Protein CHIPS ist ein im *chps*-Gen kodiertes 14,1kDa großes Protein, welches in mehr als 60% der Isolate vorkommt. Es bindet an Formylpeptidrezeptoren (FPR) und den C5a-Rezeptor der neutrophilen Granulozyten und verhindert somit Chemotaxis [Foster, 2005]. Der Staphylococcus complement inhibitor (SCIN) ist ein 9,8kDa großes Protein, kodiert im *scn*-Gen, welches die Komplementkaskade inaktiviert [Rooijackers et al., 2005] und nebenbei auch die Phagozytose durch Neutrophile blockieren kann [Foster, 2005].

Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs)

Oberflächenproteine fungieren als Adhäsine. Wie schon in der Benennung erkennen MSCRAMMs Extrazellulärmatrixmoleküle und spielen somit eine Rolle in der Kolonisierung des Wirtes [Patti et al., 1994]. Neben der Fähigkeit zur Adhäsion erfüllen MSCRAMMs weitere Funktionen, weshalb sie als Familie von Proteinen mit strukturellen Gemeinsamkeiten sowie einem gemeinsamen Mechanismus der Ligandenbindung zusammengefasst werden [Foster et al., 2014]. Als Prototyp der Oberflächenproteine gilt das Protein A mit antiphagozytärer Aktivität. Es bindet die Fc-Region der Immunglobuline, führt somit zur konsekutiven Inaktivierung der Antikörper [Crossley and Archer, 1997; Uhlen et al., 1984] und verhilft bei der Immunevasion. Ebenfalls beteiligt an der Immunevasion sind die Clumpingfaktoren *clfA* und *clfB*, sie binden Fibrinogen und Thrombozyten, *clfB* bindet zusätzlich an Zytokeratin 10 [O'Brien et al., 2002] und so an nasale epitheliale Zellen [O'Brien et al., 2002; Roche et al., 2003]. Weitere Oberflächenproteine, das für *S. aureus* surface Proteine, existieren. Unter anderem bindet *sasG* an einen unbekanntem Liganden und somit an nasale epitheliale Zellen [O'Brien et al., 2002; Roche et al., 2003]. Kollagen-bindende Proteine, wie das *cna*, binden wortgetreu Kollagen [Zong et al., 2005] und werden in Zusammenhang mit Osteomyelitiden gebracht [Patti et al., 1994]. Das extrazelluläre Adhärenzprotein EAP, auch MAP, wirkt immunmodulatorisch [Lee et al., 2002], es verhindert die Leukozytenadhäsion, Diapedese und Extravasation und inhibiert somit im Einklang mit den anderen Chemotaxis-inhibierenden Proteinen die Rekrutierung der Granulozyten zum Ort der Entzündung [Foster, 2005]. Weitere Adhäsionsfaktoren sind Fibronectin-bindende Proteine *fnA* und *fnB* und Lactoferrin-bindende Proteine.

Kapsel und Biofilm

Ebenfalls zum Schutz vor Phagozytose dient die Bakterienkapsel. Aktuell sind elf Kapseltypen bekannt, die von Staphylokokken gebildet werden, wovon die

Kapseltypen 5 und 8 bei über 75% der menschlichen Infektionen verantwortlich sind [Lowy, 1998]. Staphylokokken sind auch in der Lage einen sog. Biofilm zu bilden. Der Biofilm ist ein Netzwerk aus Polysacchariden und Proteinen, welches dem Bakterium ein mechanisch stabiles Gerüst zum Schutz vor Abwehrmechanismen des Wirtes und antimikrobiellen Wirkstoffen bietet [Donlan and Costerton, 2002]. Immer häufiger tauchen auch *S. aureus* mit Biofilm auf, der zur Kolonisation und besonders zur Persistenz an amorphen Materialien, wie Kathetern und Biomaterialien beiträgt. Die Zellwand besteht aus Peptidoglycanen und Lipoteichonsäure mit endotoxinartiger Aktivität, die zur Zytokinfreisetzung, Komplementaktivierung und Thrombozytenaggregation führt [Lowy, 1998].

3.4 Typisierungsmethoden

Die verschiedenen phäno- und genotypischen Methoden unterscheiden sich in ihrer Genauigkeit, Trennschärfe und Reproduzierbarkeit [van Belkum et al., 2009; Weller, 2000]. Im Folgenden werden hier die gängigen Methoden PFGE, spa-Typisierung, MLST, Ganzgenomsequenzierung und die Mikroarray-Analyse vorgestellt.

3.4.1 Pulsfeldgelelektrophorese

Zur Genotypisierung von *S. aureus* wurde die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) erstmals 1991 eingesetzt [Prevost et al., 1991]. Die DNA wird mit selten schneidenden Restriktionsenzymen, in diesem Fall *sma1*, in große chromosomale Abschnitte geschnitten. Im Anschluss erfolgt die Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese. Diese Methode hat sich aufgrund des hohen Diskriminierungspotential und der guten Reproduzierbarkeit zum Goldstandard entwickelt. Jedoch ist die PFGE, wie alle gel- und bildbasierten Verfahren, ein subjektives Verfahren und schwierig zu standardisieren. Vergleiche zwischen verschiedenen Laboren sind nicht möglich, auch fehlt die Möglichkeit zur Etablierung einer Datenbank für globale Analysen. Ebenfalls unvorteilhaft scheint

die mangelnde Stabilität der Restriktionsstellen bei Verfolgen von *S. aureus* Stämmen über einen längeren Zeitraum zu sein [Hallin et al., 2007].

3.4.2 Staphylokokken Protein A (spa)-Typisierung

Das Protein A ist ein 42 kDa-Protein, das an der Zellwand von *S. aureus* verankert ist. Es gehört zu den im Voraus erwähnten Oberflächenproteinen. Das zugehörige etwa 2150bp lange Gen besteht aus verschiedenen Regionen: eine Fc-Region, die das N-terminale Ende des Protein kodiert, welches mit den Immunglobulinen bindet, eine Region X und eine Sequenz, die das C-terminale Ende des Proteins, die Verankerung an der Zellwand, kodiert [Guss et al., 1984]. Die X-Region ist eine hochpolymorphe, genetisch stabile Region, die aus einer variablen Anzahl an 24bp Repeats besteht [Uhlen et al., 1984]. Die Vielgestaltigkeit ist das Resultat der unterschiedlichen Anzahl und der Sequenzabfolge dieser Repeats je nach Stamm [Frenay et al., 1996]. Mittels PCR werden die Sequenzen der Region X vervielfältigt. Die Anzahl und Zusammenstellung der Repeats, mögliche Änderungen durch Punktmutationen oder Deletionen, sind für jeden spa-Typ charakteristisch. Mittels kommerzieller Software (*Ridom StaphType*) erfolgen die genaue Zuordnung zum spa-Typ und Aufnahme in eine weltweite Datenbank. Die Region X wurde erstmals 1984 durch Uhlen et al. sequenziert, 1994 untersuchte Frénay erstmals die epidemiologische Bedeutung der spa-Typisierung [Frenay et al., 1994; Uhlen et al., 1984]. Mittlerweile ist die Single-Locus-DNA-Sequenzierung dieser hypervariablen Region ein fester Bestandteil der Diagnostik, insbesondere aufgrund der schnellen und einfachen Durchführbarkeit, der leichten und objektiven Interpretation und dem Zugriff auf eine globale Datenbank [Harmsen et al., 2003; Shopsin et al., 1999]. Weiterhin vorteilhaft ist, dass die spa-Sequenzierung kostengünstig und reproduzierbar [Aires-de-Sousa et al., 2006] ist. Sie eignet sich besonders für kurzzeitige Analysen von lokalen Ausbrüchen. Nachteilig ist jedoch, dass die Sequenzänderungen dazu führen können, dass epidemiologisch verwandte Isolate als Isolate unterschiedlicher Abstammung erscheinen können [van Belkum et al., 2009].

3.4.3 Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung

Anhand der im Kerngenom stabil verankerten housekeeping Gene ist über MLST eine Zuordnung zu einer bestimmten Abstammungslinie möglich [Enright et al., 2000; Maiden et al., 1998]. Sequenzen von sieben housekeeping Genen (*arcC*, *aroF*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* und *ygiY*) werden verglichen. Anhand derer kann man sie entweder als Klon bezeichnen, wenn alle sieben gleich sind (ST für Sequenztyp), zu einem klonalen Komplex zuordnen, wenn fünf von sieben gleich sind (CC für klonaler Komplex) oder als nicht verwandt deklarieren.

Entwickelt wurde MLST zur Identifizierung hochvirulenter *Neisseria meningitidis* [Maiden et al., 1998] und *Streptococcus pneumoniae* [Enright and Spratt, 1998]. Erstmals durch Enright et al. wurde 2000 eine Charakterisierung von *S. aureus* publiziert [Enright et al., 2000]. Es ist eine höchst diskriminative Methode, bei der die Sequenzen der ca. 450bp großen Fragmente der housekeeping Gene via PCR amplifiziert und mittels dieser den Sequenztypen oder klonalen Komplexen unter Zuhilfenahme der Datenbank zugeteilt werden. Von Vorteil sind hier die eindeutige Reproduzierbarkeit, die Vergleichbarkeit verschiedener Laboratorien und der mögliche Austausch über Datenbanken im Internet zur epidemiologischen Untersuchung. Unvorteilhaft sind die Kosten und die alleinige Verfügbarkeit in geeigneten, spezialisierten Laboratorien. Eine Verwandtschaftsanalyse eignet sich besonders bei langfristigen, globalen Studien [Feil and Enright, 2004; Hallin et al., 2008]. Jedoch vermag es aufgrund der langsamen Akkumulation der genetischen Variation in den housekeeping Genen zum mangelnden Diskriminierungspotential bei epidemiologisch nicht verwandten Stämmen kommen [Cooper and Feil, 2004]. Es eignet sich nicht bei lokalen epidemischen Ausbrüchen von *S. aureus*.

3.4.4 Ganzgenomsequenzierung

Mithilfe der Ganzgenomsequenzierung ist es möglich, das komplette Genom abzubilden. Man erhält hiermit mehr Informationen als durch die anderen Typisierungsmethoden. 1995 wurde erstmals das komplette Genom von

Haemophilus influenzae entschlüsselt [Fleischmann et al., 1995]. Eine Sequenzierung des gesamten Genoms von *S. aureus* entdeckte einen wohl gemeinsamen Ursprung mit *Bacillus subtilis* [Kuroda et al., 2001]. Bisher sind einige komplette Genome von *S. aureus* sequenziert worden. Zur Erstellung von Stammbäumen und Beobachtung der Bevölkerungsstruktur und -dynamik ist diese Methode sehr geeignet [Owen, 2004]. Nachteilig sind die hohen Kosten und die Bindung an spezialisierte Labore.

3.4.5 Mikroarray

Mithilfe von DNA-Mikroarrays lassen sich über ein Hybridisierungsverfahren beliebige Zielgene darstellen. Durch die Chiptechnologie wird gleichzeitig eine große Anzahl an molekularen Zielen detektiert. Im Falle des *S. aureus*-DNA-Mikroarrays werden anhand von 334 Spots auf dem Chip 283 verschiedene Gene analysiert. Zu den erfassten Genen gehören Speziesmarker, sog. Taxonomiemarker, Resistenzgene, Virulenzgene, Gene zur SCCmec-Typisierung, zur agr-Typisierung, für die Kapseltypen, den Biofilm, die MSCRAMMs und weitere Adhäsionsfaktoren, für die Immunevasion, für Enterotoxine und Superantigen-ähnliche Proteine.

Anhand des Hybridisierungsprofils lassen sich auch Verwandtschaften zwischen den einzelnen Stämmen nachvollziehen [Monecke et al., 2008]. So kombiniert diese Methode eine epidemiologische Untersuchung mit der Detektion klinisch relevanter Faktoren.

Die Analyse basiert auf einer Hybridisierungsreaktion der, via linearer PCR, mit Biotin markierten Einzelstränge mit den Spots des Arrays, welche mit Hilfe kommerzieller Software, *Iconoclust*, sichtbar gemacht wird [Monecke et al., 2008].

Monecke et al. konnten zeigen, dass anhand des Hybridisierungsprofils eine Zuordnung zu den MLST-basierten klonalen Komplexen möglich ist [Monecke et al., 2008]. Verwandte Stämme tragen nicht immer z. B. die gleichen

Resistenzfaktoren, lassen sich aber anhand bestimmter Hybridisierungsmuster den jeweiligen Gruppen zuordnen. So ist es z. B. möglich, dass Elemente in einem Komplex *SCCmec* oder PVL tragen und einige nicht. Das hohe Diskriminierungspotential erhält die Chiptechnologie vor allem durch Detektion der Allelvarianten, gruppenspezifischer Gene, Genclustern, Gendeletionen und Erkennen variabler Elemente. Besonders wertvoll für die epidemiologische Untersuchung ist diese Methode, da sich kürzlich aufgetretene Variationen in bestimmten Genen, z. B. durch mobile Elemente übertragen wie *SCCmec*, Plasmide oder Phagen, detektieren lassen, die Zuordnung in die Komplexe jedoch unabhängig von diesen Faktoren bleibt. So kommt es zu keiner Verzerrung der Verwandtschaftsanalyse, individuelle Unterschiede lassen sich weiterhin darstellen.

Vorteil dieser Methode ist neben der einfachen Durchführbarkeit, der Objektivierbarkeit der Analyse und der Möglichkeit des Erstellens einer Datenbank, die Fülle an Information, die man mit geringem Zeitaufwand erhält. Zudem ist sie im Gegensatz zur Ganzgenomsequenzierung gut in der klinischen Routine zu etablieren. Von Nachteil ist die begrenzte Möglichkeit, Mutationen zu detektieren sowie die fehlende Aussage, ob die detektierten Gene exprimiert werden.

3.5 Geographische Unterschiede (Deutschland/Afrika)

Die meisten Studien zur Epidemiologie von *S. aureus* stammen aus westlichen Ländern, so dass die bisher erhobenen Daten nicht verallgemeinert werden können. Es existieren weiterhin mehrere Studien mit Probanden aus Krankenhäusern. Aktuell mangelt es an Studien mit Isolaten aus der Gesellschaft (community-based). Feil et al. haben keine signifikanten Unterschiede in den Genotypen der invasiven und kommensalen Isolate gefunden [Feil et al., 2003].

In den Entwicklungs- und Schwellenländern, besonders in Afrika, liegt das Hauptaugenmerk auf den drei großen tropischen Krankheiten HIV/AIDS,

Tuberkulose und Malaria. Diese drei erhalten global mehr Aufmerksamkeit, insbesondere im Hinblick auf Diagnostik, Therapie, Forschung und Prävention. Jedoch existiert schon von der WHO eine Liste der sog. neglected tropical diseases (NTD), die vernachlässigten tropischen Erkrankungen, denen wohl zu wenig Aufmerksamkeit entgegengebracht wird. Herrmann et al. fordern, Erkrankungen, die u. a. durch gram positive Kokken - hauptsächlich *S. aureus* - hervorgerufen werden, ebenfalls zu diesen NTDs hinzuzuzählen und ihnen eine erhöhte Aufmerksamkeit zu widmen [Herrmann et al., 2013]. Mit dem Einrichten des *african-german-staphnet*, unter dem diese Arbeit hier entstanden ist, wurden erste Schritte zur Verbesserung der Diagnostik und Therapie von *S. aureus* Erkrankungen, die das Leben und die Gesundheit der Menschen in Afrika sehr beeinflussen, eingeleitet. Die Inzidenzraten der Infektionen durch *S. aureus* sind höher als von den betroffenen Ländern berichtet [Berkley et al., 2005]. Verschiedene Studien zeigen eine Prävalenz von 27-34% [Ateba Ngoa et al., 2012]. In Tansania und benachbarten Ländern werden vermehrt MRSA isoliert [Herrmann et al., 2013], sowie vermehrte Resistenzen gegen gängige Antibiotika wie Penicilline und Tetrazykline [Urassa et al., 1999]. Studien aus Uganda weisen ebenfalls erhöhte Raten an MRSA auf, die gegen viele Alternativpräparate resistent sind und nach teureren Antibiotika, wie Glycopeptiden, verlangen [Ojulong et al., 2009]. Weitere Studien über die Resistenzsituation in Afrika zeigen eine hohe Prävalenz für MRSA sowohl als HIV-Koinfektion [Cotton et al., 2008; Heysell et al., 2011] als auch in Patienten mit nosokomialen Infektionen [Ojulong et al., 2009]. Das Krankenhausumfeld an sich gilt als Risikofaktor für die Trägerschaft mit *S. aureus*, eine Unterbringung auf eine Intensivstation (ICU) erhöht dieses Risiko [Cavalcanti et al., 2005]. Da in ländlichen Regionen Afrikas die Mittel zur Kontrolle nosokomialer Infektionen fehlen, ist dies in Afrika von besonderem Interesse [Ako-Nai et al., 1991; Ghebremedhin et al., 2009].

Bisherige Studien zeigen, dass *S. aureus* neben Pneumokokken das häufigste isolierte grampositive Bakterium ist [Berkley et al., 2005], bevorzugt assoziiert mit unterernährten Kindern [Collignon et al., 2006], während der Neonatalperiode [Mugalu et al., 2006; Ojukwu et al., 2006] bzw. sich ausweitend auf die gesamte

Kindheit [Hill et al., 2007; Meremikwu et al., 2005; Srinivasan et al., 2009]. Im Gegensatz zu entwickelten Ländern betrifft ein Großteil der Bakteriämien in Afrika Neugeborene und Kinder [Anah et al., 2008; Onipede et al., 2009]. In Mosambique beträgt die Inzidenz der Bakteriämien 425 auf 100.000 Einwohner [Herrmann et al., 2013]. In Afrika insgesamt sind CA-*S.aureus* Bakteriämien mit 9,5% häufiger anzutreffen als Meningokokkensepsis mit 1% [Herrmann et al., 2013].

In afrikanischen *S. aureus* Isolaten finden sich häufiger PVL-positive Isolate, sowohl in klinischen als auch in nasalen Isolaten [Breurec et al., 2011; Okon et al., 2009; Ramdani-Bouguessa et al., 2006; Schaumburg et al., 2011].

Bisher fehlen noch eindeutige Ergebnisse aus geplanten und organisierten Studien bezüglich der epidemiologischen Zusammenhänge in afrikanischen Isolaten.

3.6 Zielsetzung

Vornehmliche Zielsetzungen dieser Studie waren die Aufdeckung der Unterschiede zwischen kolonisierenden und invasiven *S. aureus* Isolaten sowie der Vergleich der Isolate aus Deutschland (Homburg/Saar) und Tansania (Ifakara). Hierfür erfolgte im Rahmen des *african-german-staphnet* prospektiv eine Sammlung invasiver und kolonisierender *S. aureus*. Mittels Mikroarray Analyse (Identibac®) sollten anhand der 283 Genloci verschiedene Teilaspekte untersucht werden: 1. Die Phylogenie anhand der klonalen Komplexe, 2. das genetische Repertoire der gesamten Isolate an Resistenzfaktoren und 3. an Virulenzfaktoren mit besonderer Berücksichtigung der klassischen Toxine, des PVL-Toxins und der Adhäsine. Basierend auf den Genmustern sollten geographische Unterschiede als auch Unterschiede zwischen kolonisierenden und invasiven Stämmen untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Probanden

100 gesunde Probanden aus Homburg und Umgebung mit kommensaler Besiedlung des Nasenvorhofs durch *Staphylococcus aureus* bildeten unsere Gruppe der Nasenabstriche aus Homburg/Saar, im Weiteren bezeichnet als HS-N. Eingeschlossen in diese Studie wurden Teilnehmer, die innerhalb der letzten vier Wochen weder antibiotisch noch antituberkulotisch behandelt wurden und zudem nicht in einem Krankenhaus stationär aufgenommen wurden.

Die 100 nasalen Abstriche aus Ifakara/Tansania (IT-N) wurden gemäß den Richtlinien des Konsortiums vor Ort gesammelt und uns zur weiteren Diagnostik zur Verfügung gestellt.

4.2 Patienten

100 Patienten mit ambulant erworbenen *Staphylococcus aureus* Infektionen bildeten unsere Gruppe der klinischen Abstriche aus Homburg/Saar, im Weiteren bezeichnet als HS-O für sog. „other“-Proben, aus Wunden isolierte *S. aureus* Stämme, und HS-B für Bakteriämien mit *S. aureus*. Eingeschlossen wurden hier Isolate, die innerhalb 48 Stunden nach Aufnahme in das Krankenhaus („community-onset disease“) gesammelt wurden. Nasen- und Rachenabstriche wurden ausgeschlossen. Die Isolate wurden in der Krankenhausroutinediagnostik nach den entsprechenden Standards (MIQ - mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards) kultiviert und identifiziert.

Die 100 klinischen Isolate aus Ifakara/Tansania (IT-O und IT-B) wurden gemäß den Richtlinien des Konsortiums vor Ort gesammelt und uns zur weiteren Diagnostik zur Verfügung gestellt.

4.3 Probandendaten/Patientendaten

Die Studie wurde nach den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission des Saarlandes (federführende Ethikkommission) und Tansanias genehmigt. Die Kennnummer lautet: 19/09.

Voraussetzung für die Studienteilnahme war das schriftliche Einverständnis der Probanden und Patienten. Die Erfassung der Probanden- und Patientendaten erfolgte mit standardisierten Fragebögen des *african-german-staphnet*. Es wurden allgemeine Daten zur Person, wie Geschlecht und Geburtsdatum, sowie demographische Daten, wie Geburtsort, ethnische Zugehörigkeit und aktueller Wohnort gesammelt. In beiden Untergruppen wurden spezifische Risikofaktoren, wie z. B. intravenöser Drogenabusus, intravaskuläre und andere Fremdkörper und eine bestehende HIV-Infektion, Komorbiditäten, entsprechend des Charlson-Komorbiditäten-Scores, sowie zugrundeliegende Krankheiten, entsprechend des McCabe-Prognosescores, abgefragt.

Es wurde weiterhin erfragt, ob die Patienten im letzten halben Jahr stationär waren, an welchen Erkrankungen sie litten und ob sie in einer Pflegeeinrichtung lebten.

Die Patienten wurden nach Krankenhausaufenthalten in den letzten sechs Monaten, engem Kontakt zu Gesundheitseinrichtungen innerhalb des letzten Monats, Leben in Pflegeeinrichtungen, Tuberkuloseanamnese, sowie Medikamentenanamnese bezüglich antibiotischer und antituberkulotischer Therapie innerhalb der letzten vier Wochen befragt. Von Interesse war auch die klinische Präsentation der Infektion, also Lokalisation und Auftreten einer Sepsis oder eines septischen Schocks. Dokumentiert wurde die antibiotische Therapie, die die Patienten im UKS aufgrund der Erkrankung erhielten und ob ein chirurgischer Eingriff zur Infektsanierung durchgeführt wurde. Die Art des chirurgischen Eingriffs wurde ebenfalls festgehalten.

Die Fragebögen wurden in der Datenbank des IBMT aufgenommen, so dass alle Kooperationspartner des *african-german-staphnet* darauf Zugriff haben.

4.4 Identifikation

Nach Abstreichen des Nasenvorhofs der Probanden mittels eSwab wurden diese innerhalb kürzester Zeit mit einem 3-Impfösen-Ausstrich auf TSA-Platten ausplattiert. Nach 24-48 Stunden Wachstum bei 37°C wurden die Isolate mit typischer *S. aureus* Morphologie und β -Hämolyse in Reinkultur isoliert. Nach weiterer Selektion mittels des Latex-Agglutinationstests wurden die Reinkulturen mittels MALDI-TOF Analyse identifiziert. Die Isolate wurden mehrfach im IBMT bei -200°C kryokonserviert.

4.5 Antibiotikaresistenztestung

Die durchgeführten Empfindlichkeitsprüfungen erfolgten nach der Bauer-Kirby-Methode (CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute). Nach Inokulation einer Kolonie in 2,5ml H₂O und einem McFarland von 0,5 erfolgte ein 3-Ebenen-Ausstrich auf Müller-Hinton-Agar. Nach Aufbringen der Testplättchen mittels Antibiotika-Stempel erfolgte eine Übernachtbebrütung bei 37°C. Am nächsten Tag wurden die Durchmesser der Hemmhöfe gemessen und die Resistenzen bestimmt:

Tabelle 1: Hemmhofkriterien nach Bauer-Kirby-Methode (CLSI, M100-S16, 2006) [mm]

	R (resistent)	I (intermediär)	S (sensibel)
Penicillin (P)	≤ 28	-	≥ 29
Oxacillin (OX)	≤ 10	11 - 12	≥ 13
Clindamycin (CC)	≤ 14	15 - 20	≥ 21
Erythromycin (E)	≤ 13	14 - 22	≥ 23
Doxycyclin (D)	≤ 12	13 – 15	≥ 16
Gentamicin (GM)	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Chloramphenicol (C)	≤ 12	13 – 17	≥ 18
Cotrimoxazol (SXT)	≤ 10	11 - 15	≥ 16
Cefoxitin (FOX)	≤ 19	-	≥ 20

Oxacillin wurde nur bei den ersten 49 HS-N-Isolaten eingesetzt, da Cefoxitin zur MRSA-Detektion ausreicht. Die klinischen Isolate wurden in der Routinediagnostik im VITEK der Resistenzprüfung unterzogen. Chloramphenicol wurde separat über die Bauer-Kirby-Methode getestet.

D-Tests führten wir bei Isolaten (HS-N), die Erythromycin intermediär oder resistent waren, zur Überprüfung einer induzierbaren Clindamycinresistenz, durch.

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde für MRSA-positive Proben für folgende Antibiotika bestimmt: Linezolid, Daptomycin, Cefoxitin, Clindamycin, Vancomycin, Tigecyclin.

4.6 Kulturelle Anzucht

Zur Präparation der DNA wurden die Isolate am Vortag aufgetaut. Dafür wurden zwei beads der Cryobankröhrchen auf einer Seite der TSA-Blutplatte ausgelegt, um danach einen 3-Impfösen-Ausstrich anzuschließen. Sie wurden über Nacht bei 37°C bebrütet.

4.7 DNA-Aufreinigung

Die DNA-Aufreinigung erfolgte entsprechend der Herstellerinformation des Qiagen DNeasy® Blood&Tissue Kits(250) mit spezifischen Modifikationen des Identibac® *S. aureus* Genotyping-Protokolls.

Zur Vorbereitung wurde zu Beginn für jedes aufzureinigende Isolat ein Eppendorfreaktionsgefäß A2 mit Lyseverstärker aus dem Identibac® *S. aureus* Genotyping-Kit für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit (13000U/min) zentrifugiert. 200µl des Lysepuffers A1, ebenfalls aus dem Identibac® *S. aureus* Genotyping-Kit, wurden in die A2-Eppendorfreaktionsgefäße vorgelegt und nach dem Vortexen für fünf Minuten bei Raumtemperatur gelöst. In diesen Enzym-Mix wurde eine volle 2µl Impföse der *S. aureus* Kolonien eingerührt, bis keine soliden

Bestandteile mehr sichtbar waren und sich die Lösung deutlich getrübt hat. Diese Suspension wurde für eine Stunde bei 37°C und 550rpm im Thermorüttler inkubiert. 200µl Lysepuffer AL und 40µl Proteinase K wurden nach dieser Stunde hinzupipettiert. Der Ansatz wurde gevortext und für eine weitere Stunde bei 56°C und 550rpm inkubiert. Darauf folgte ein kurzer Anzentrifugationsschritt. Zur DNA-Ausfällung wurde im nächsten Schritt 200µl Ethanol 100% hinzugegeben. Die gesamte Flüssigkeit wurde auf die Qiagen-Kit-Säule aufgetragen, welche bei 6000g für eine Minute zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein neues Tube gesetzt. Als Nächstes folgten die Waschschriffe mit 500µl Waschpuffer AW1, eine Minute Zentrifugieren bei 6000g und Verwerfen des Durchflusses. Nach Aufsetzen auf ein neues Tube wurden 500µl AW2-Waschpuffer auf die Säule aufgetragen und bei maximaler Geschwindigkeit drei Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule nochmals für eine Minute auf höchster Stufe zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein autoklaviertes Eppendorfreaktionsgefäß gesetzt. Auf die Säule wurde 40µl Elutionspuffer AE pipettiert. Nach drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsgefäße mit der Säule für eine Minute bei 6000g zentrifugiert. Die isolierte DNA befand sich nun im Eluat.

4.8 Messung der DNA-Konzentration

Die isolierte DNA wurde mit NanoDrop2000 spektralphotometrisch gemessen. Nach Reinigung der Linsen und Blanken mit 2µl des Elutionspuffers AE wurden jeweils 2µl der isolierten DNA eines aufgereinigten Isolates gemessen. DNA-Konzentrationen über 80ng/µl mit einem Reinheitsquotienten (OD260/OD280) von 1,8 bis 2,0 wurden verwendet. Für die lineare PCR wurde eine DNA-Konzentration von 0,5-1,5µg/5µl benötigt.

4.9 DNA-Markierung (PCR)

Das Protokoll entsprach den Herstellerangaben des Identibac® *S. aureus* Genotyping-Kits.

Zur weiteren Analyse wurde eine lineare PCR durchgeführt und die Einzelstränge mit Biotin-dUTP markiert. Für die PCR wurde ein Mastermix mit jeweils 4,9µl Markierungspuffer B1 (Identibac®) und 0,1µl DNA-Polymerase B2 (Identibac®) pro Probe angesetzt und auf Minireaktionsgefäße verteilt. Das Endvolumen im PCR-Gemisch musste 10µl sein, bestehend aus 5µl Mastermix und 5µl DNA (ggf. mit H₂O verdünnt). Nach Mischen und kurzer Zentrifugation wurde die 96-minütige PCR gestartet. Einzelne PCR-Schritte im Thermocycler waren ein Aufheizen des Deckels auf 105°C, gefolgt von 300 Sekunden Denaturierung bei 96°C. Es folgten 45 Zyklen mit jeweils 20 Sekunden bei 50°C zum Primerannealing, 30 Sekunden bei 72°C zur Elongation und 20 Sekunden bei 96°C zur erneuten Denaturierung. Nach Ende der Amplifikation und Markierung kühlte der Thermocycler auf 4°C ab.

4.10 DNA-Hybridisierung Mikroarray

Nach der PCR wurde in jedes Reaktionsgefäß 90µl des Hybridisierungspuffers C1 hinzupipettiert.

Die ArrayStrips wurden mit 200µl RNase-freiem A. dest. gespült. Zur Hybridisierung wurden 200µl C1 in die freien ArrayStrips pipettiert, welche anschließend bei 55°C und 550rpm für zwei Minuten im Thermocycler inkubiert wurden. Im Anschluss wurde das gesamte Volumen abgezogen und der komplette PCR-Mix in die ArrayStrips übertragen. Die ArrayStrips wurden nun mit einem Deckel verschlossen und für eine Stunde bei 55°C und 550rpm im Thermomixer inkubiert.

Zur Vorbereitung der Färbereaktion wurden pro Probe 1µl des Horseradish-Peroxidase-Konjugates C3 (Identibac®) und 99µl des Konjugatpuffers C4 (Identibac®) gemischt.

Nach Ende der Inkubation wurde alle Flüssigkeit aus den Streifen abgezogen und drei sich wiederholende Waschschrte mit jeweils 200µl des Waschpuffers C2 ausgeführt. Anschließend wurden je 100µl des Peroxidase-Mixes C3/C4 in die Streifen pipettiert und ohne Deckel für zehn Minuten bei 30°C bei 550rpm im

Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Mix abpipettiert und die ArrayStrips zweimal mit jeweils 200µl des Waschpuffers C5 gewaschen. Zum Schluss wurden 100µl des zentrifugierten und auf Raumtemperatur erwärmten Horseradish-Peroxidase-Substrates D1 in die Arrays übertragen und bei Raumtemperatur für fünf Minuten unter Abdunkelung inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die komplette Flüssigkeit abgezogen und der ArrayStripFrame zur Analyse im ArrayMate-Reader eingesetzt. Der Reader lieferte uns neben der Fotodatei HTML-Output-Dateien mit den Hybridisierungssonden.

4.11 Spa-Typisierung

Die DNA-Gewinnung erfolgte durch Einrühren einer *S. aureus* Kolonie in 200µl oder 250µl Aqua dest. und nachfolgendem Kochen bei 95°C für zehn Minuten bei 550rpm. Anschließend wurden die Proben bei 13000U/min für drei Minuten zentrifugiert. Im Überstand befand sich nun die DNA.

2,5µl DNA wurden in folgenden Reaktionsansatz pipettiert und in einer PCR amplifiziert:

10µl H₂O

12,5µl PCR – Mix (peqGOLD Hot-Start-Mix Y)

0,25µl Primer forward

0,25µl Primer revers

Einzelne Schritte der PCR waren eine initiale fünfminütige Denaturierung bei 80°C, gefolgt von 35 Zyklen von Denaturierung (45 Sekunden bei 94°C), Anlagern (45 Sekunden bei 60°C) und Verlängerung (90 Sekunden bei 72°C) mit einer letzten Verlängerung über zehn Minuten bei 72°C.

Das PCR-Produkt wurde anschließend verdaut (zum Abverdau der Primer). 5µl des zentrifugierten ExoSAP-IT und 5µl des Amplifikates wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert, gründlich gemischt und nochmals zentrifugiert. Es folgten 15 Minuten Inkubation im Thermorüttler bei 37°C und 15 Minuten Inkubation bei 65°C.

DNA-Analyse mittels Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für ein 1%-iges Agarosegel mit 80 Taschen wurden 2g Agarose in 200ml TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle ohne Überkochen gelöst. Nach Abkühlen des flüssigen Agarosegels wurde das Gel in eine austarierte Gelform gegossen. Nach circa einer halben Stunde wurde das feste Gel in eine mit TBE-Puffer befüllte Kammer eingelegt.

Im Anschluss an die PCR wurde pro PCR-Produkt jeweils 2µl Ladepuffer auf Parafilm vorgelegt, mit jeweils 3µl Amplifikat gemischt und auf das Gel aufgetragen.

Die Negativkontrolle und einen Ladder ließen wir zusätzlich mitlaufen. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150V für 35 Minuten.

4.12 Statistische Methoden und Auswertung

Im Mikroarray wurden 283 Genloci detektiert (s. Liste im Anhang der Genloci mit Beschreibung und Abkürzungen). Alle beschriebenen Isolate wurden mit der Softwareversion 2009-07-09 gemessen. Die statistische Untersuchung erfolgte bei Genen, die sich in ihrem Vorkommen in Homburg und Ifakara um mehr als 5% unterschieden. Die Daten wurden als absolute und relative Häufigkeiten beurteilt. Zum Ermitteln signifikanter Unterschiede zwischen beiden Standorten (Homburg, Tansania) und beiden Isolatursprüngen (kolonisierend, invasiv) wurde der exakte Fisher-Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ definiert. Unberücksichtigt blieben die Speziesmarker und regulatorischen Gene, da sie als Taxonomiemarker naturgemäß bei allen *Staphylococcus aureus* vorkommen. Ebenfalls unberücksichtigt blieben einzelne Allele zu bestimmten Genen (Bsp: *clfA-COL+RF122*, *clfA-MRSA252*, *clfA-Mu50/MW2*), wenn die Gene in ihrer Gesamtheit (Bsp: *clfA-all*) detektiert wurden. Auch bei den Kapseltypen wurde auf die den unterschiedlichen Kapseltypen zugehörigen Enzyme und Proteine verzichtet. Der Einfachheit und besseren Übersichtlichkeit wurde bei der

Betalaktamase- und Tetrazyklinresistenz jeweils nur ein Locus (*blaZ* und *tetK*) ausgewählt. Beim *ACME*-Lokus wurde der *ACME*-Lokus selbst, nicht die 4 einzelnen Loci, betrachtet. Nicht in Betracht gezogen wurden außerdem einzelne Gene, die in unserer Auswertung als nicht reliabel aufgefallen waren. Die Gene, die in mehr als 10% der Fälle ambiguous Signale (*Q2YUB3* und *ccrB-1*) lieferten oder sich in Wiederholungen ein und desselben Keimes um $\geq 20\%$ (*ccrB-1*, *Q2YUB3*, *entD*, *xyIR*, *dfrA*, *entB*, *sasG*, *entO* und *aur*) änderten, wurden als nicht zuverlässig betrachtet.

Für die globale Analyse der Mikroarraydaten in den Kapiteln 5.3.2, 5.4 und 5.5 wurden alle 283 Genloci berücksichtigt. Die Auswertung der agglomerativen hierarchischen Clusteranalyse erfolgte in Kooperation mit dem Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes (Prof. Dr. Volkhard Helms, Ruslan Akulenko).

4.13 Materialnachweis

Geräte	Firma, Sitz
Brutschrank	Heraeus, Langenselbold/Deutschland
Mikro 20	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/Deutschland
Thermomixer comfort Minizentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland
Vortex Genie	Scientific Industries, New York/USA
Nano Drop™ 2000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen/Deutschland
Biometra UNO Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen/Deutschland
FlexCycler	Analytik Jena AG, Jena/Deutschland
ArrayMate™ Reader	Alere GmbH, Köln/Deutschland
Power Pac 1000 Molecular Imager® GelDoc XR ⁺ Agarosegelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München/Deutschland
Antibiotikastempel	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg/Deutschland
VITEK® 2 Photometer für McFarland	BioMérieux, Marcy-l'Etoile/Frankreich
MALDI-TOF MS	Bruker, Billerica/USA
Kits	Firma, Sitz
Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden/ Deutschland
Identibac® S.aureus Genotyping	Alere GmbH, Köln/Deutschland
Chemikalien/Reagenzien	Firma, Sitz
peqGOLD Hot Start-Mix Y	PEQLAB, Erlangen/Deutschland
Nuclease-Free Water	Promega, Mannheim/Deutschland
USB® ExoSAP-IT	Affymetrix, Inc., Ohio/USA
SybrGold	Invitrogen, Oregon/USA
Primer	Sequenz
Primer 20 (spa-1113f)	TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C
Primer 21 (spa-1514r)	CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT

Software	Firma, Sitz
Iconoclust	Alere GmbH, Köln/Deutschland
NanoDrop 2000/2000c	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen/Deutschland
RidomStaphType	Ridom GmbH, Münster/Deutschland
ImageLab™	Bio-Rad, München/Deutschland
Word/Excel	Microsoft, Redmond/USA
M/Lab	Dorner GmbH & Co. KG, Müllheim (Baden)/ Deutschland
Acrobat Reader	Adobe, Dublin/Irland
Laborbedarf	Firma, Sitz
eSwab collection & preservation	COPAN Italia S.p.A., Brescia/Italien
Trypticase™ Soy Agar (TSA) II with 5% sheep blood - BD BBL™ Stacker™ Plates Müller-Hinton-Agar Antibiotika Testplättchen BD Sensi-Disc	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg/Deutschland
Pastorex™ Latex Test	Bio-Rad, Marnes-la-Coquette/Frankreich
Cryobank™	Mast Diagnostica Laboratoriumspräparate GmbH, Reinfeld/Deutschland
MIC Test-Strips (E-Test)	Liofilchem® s.r.l., Roseto degli Abruzzi (Te)/Italien
Costar Mehrkanalpipette	Corning Incorporated, Corning/USA
Transferpipette ©S -8/-12	Brand GmbH & Co KG, Wertheim/Deutschland
Pipettenspitzen, Impfösen	Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland
Zellkulturtestplatte 96F TPP	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen/Schweiz

5 Ergebnisse

5.1 Studienteilnehmer

Innerhalb eines Zeitraumes von zwei Monaten wurden von 285 gesunden Freiwilligen aus Homburg und Umgebung Abstriche entnommen. 105 gesicherte kommensale *Staphylococcus aureus* Isolate waren das Ergebnis. Dies entsprach einer Prävalenz von 36,84%. Die Gruppe der klinischen Isolate bestand ebenfalls aus 105 Patienten, davon 98 Wundabstriche und sieben Isolate aus Bakteriämien.

Die im Folgenden besprochenen Mikroarraydaten wurden von jeweils 100 kommensalen und invasiven Isolaten aus beiden Standorten Homburg und Tansania untersucht, sodass letztlich 400 Isolate analysiert wurden.

5.2 Genübersicht Mikroarray

Zwischen beiden Standorten zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede für die in Tabelle 2 aufgelisteten Gene. In Tabelle 2a wurden die Gene, die statistisch signifikant häufiger in Ifakara vorkamen, in Tabelle 2b die Gene, die statistisch signifikant häufiger in Homburg vorkamen, aufgelistet. Wie zu sehen, zeigten sich mehr Gene statistisch signifikant häufiger in Tansania. Die Unterschiede zeigten sich hauptsächlich bei den Genen für Resistenzfaktoren, Virulenzfaktoren, MSCRAMMs und Superantigen- und Enterotoxin-ähnliche Proteine.

Tabelle 2a: Gene mit signifikant häufigerem Vorkommen in Ifakara. Die statistische Untersuchung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test.

	Gene	Abk.	Homburg (D)	Ifakara (TZ)	p - Wert
Resistenzfaktoren	Beta-Laktamase	blaZ	122 (61%)	190 (95%)	p < 0,0001
	Macrolide/Clindamycin Resistance	ermC	18 (9%)	33 (16,5%)	p = 0,0350
	Tetracycline	tetK	4 (2%)	56 (28%)	p < 0,0001
	Putative Marker for Fosfomycin, Bleomycin	fosB	122 (61%)	144 (72%)	p = 0,0259
	Mercury resistance operon	mrl	1 (0,5%)	15 (7,5%)	p = 0,0004
Virulenzfaktoren	Pantone-Valentine Leukocidin	PVL	6 (3%)	75 (37,5%)	p < 0,0001
	Leukocidin D Component	lukD	122 (61%)	147 (73,5%)	p = 0,0104
	Leukocidin E Component	lukE	110 (55%)	154 (77%)	p < 0,0001
	Leukocidin/Haemolysin Toxin Fam. Protein	lukY-var1	154 (77%)	179 (89,5%)	p = 0,0012
	Staphylokinase	sak	149 (74,5%)	173 (86,5%)	p = 0,0035
	Staph. Complement Inhibitor (SCIN)	scn	186 (93%)	199 (99,5%)	p = 0,0008
	Exfoliative Toxin A	etA	3 (1,5%)	13 (6,5%)	p = 0,0188
	Epidermal cell differentiation inhibitor B	edinB	4 (2%)	21 (10,5%)	p = 0,0006
	Serine Protease A	splA	122 (61%)	142 (71%)	p = 0,0447
	Serine Protease B	splB	123 (61,5%)	162 (81%)	p < 0,0001
agr	Accessory Gene Regulator - Type 3	agrIII	23 (11,5%)	45 (22,5%)	p = 0,0049
	Accessory Gene Regulator - Type 4	agrIV	44 (22%)	79 (39,5%)	p = 0,0002
SCCmec	Signal Transducer Protein MecR1	mecR	9 (4,5%)	26 (13%)	p = 0,0041
	Mercuric Reductase (SCCmec type III)	merA	0 (0%)	10 (5%)	p = 0,0017
	Alkylmercury Lyase (SCCmec type III)	merB	1 (0,5%)	15 (7,5%)	p = 0,0004
MSCRAMMS	Bone Sialoprotein-Binding Protein	bbp	171 (85,5%)	185 (92,5%)	p = 0,0368
	Fibrinogen Binding Protein	fib	144 (72%)	165 (82,5%)	p = 0,0168
	van Willebrand Factor-Binding Protein	vwb	179 (89,5%)	194 (97%)	p = 0,0044
Immun-evasion	Defensin Resistance	mprF	170 (85%)	194 (97%)	p < 0,0001
set / ssl	Staph. Superantigen-Like Protein 8/SSL3	set8/ssl3	143 (71,5%)	165 (82,5%)	p = 0,0123
	Staph. Superantigen-Like Protein 3/SSL5	set3/ssl5	146 (73%)	164 (82%)	p = 0,0414
	Staph. Superantigen-Like Protein 21/SSL6	set21/ssl6	69 (34,5%)	91 (45,5%)	p = 0,0319
	Staph. Superantigen-Like Protein 12/SSL8	set12/ssl8	141 (70,5%)	165 (82,5%)	p = 0,0065
	Staph. Superantigen-Like Protein 5/SSL9	set5/ssl9	143 (71,5%)	165 (82,5%)	p = 0,0123
	Staph. Superantigen-Like Protein B3	setB3	141 (70,5%)	179 (89,5%)	p < 0,0001
	Staph. Superantigen-Like Protein B2	setB2	130 (65%)	177 (88,5%)	p < 0,0001
	Staph. Superantigen-Like Protein B1	setB1	169 (84,5%)	187 (93,5%)	p = 0,0061

Tabelle 2b: Gene mit signifikant häufigerem Vorkommen in Homburg. Die statistische Untersuchung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test.

	Gene	Abk.	Homburg (D)	Ifakara (TZ)	p - Wert
Resistenz - faktoren	Macrolide/Clindamycin Resistance	ermA	17 (8,5%)	0 (0%)	p < 0,0001
Virulenz - faktoren	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	lukX	192 (96%)	168 (84%)	p < 0,0001
	Hypothetical Protein similar to Haemolysin	hl	199 (99,5%)	186 (93%)	p = 0,0008
	Serine Protease E	splE	108 (54%)	82 (41%)	p = 0,0122
agr	Accessory Gene Regulator - Type 2	agrII	66 (33%)	47 (23,5%)	p = 0,0453
Kapsel / Biofilm	Intercellular Adhesion Protein C	icaC	200 (100%)	182 (91%)	p < 0,0001
MSCRAMMS	MHC Class II Analog Protein	map	193 (96,5%)	177 (88,5%)	p = 0,0037
	Fibrinogen-, Bone Sialoprotein-Binding Protein	sdrC	199 (99,5%)	185 (92,5%)	p = 0,0004
Immun- evasion	Hypothetical Protein Next To entG	Q7A4X2	124 (62%)	88 (44%)	p = 0,0004

5.2.1 Resistenzgene

Insgesamt zeigte die Analyse der Resistenzgene beider Populationen Resistenzen gegen nur wenige Antibiotikaklassen (Abbildung 1). Statistisch signifikante Prävalenzunterschiede gab es für Resistenzgene gegen Betalaktame, Makrolide/Clindamycin, Tetrazykline und Fosfomycin/Bleomycin. Andere Resistenzgene wurden, wie gegen Glycopeptide (*vanA*, *vanB*, *vanZ*), entweder nicht gefunden oder kamen, wie gegen Aminoglycoside (*aacA-aphD*, *aad*, *aphA*), nur vereinzelt vor. Signifikante Unterschiede zwischen Homburg und Tansania (HS vs. IT) ergaben sich für *blaZ* (61 % vs. 95%), *ermA* (8,5% vs. 0%), *ermC* (9% vs. 16,5%), *tetK* (2% vs. 28%) und *fosB* (61% vs. 72%), wovon bis auf *ermA* alle genannten Gene in Afrika häufiger prävalent waren. Aus allen 400 Isolaten wurden nur acht MRSA (*mecA* positiv) ermittelt, wovon drei in Deutschland und fünf in Afrika vorkamen. Aufgrund der geringen Anzahl an MRSA wurde auf die Darstellung der SCC*mec*-Elemente verzichtet.

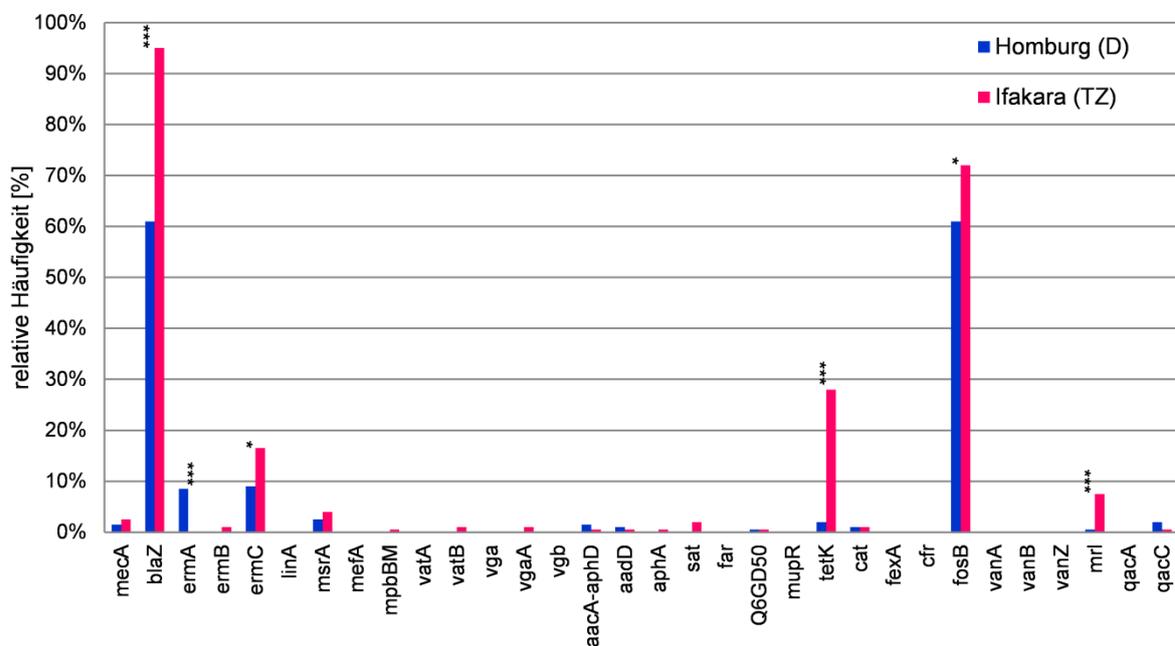


Abbildung 1: Relative Häufigkeit der Resistenzgene in Homburg und Ifakara. Die statistische Untersuchung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

5.2.2 Virulenzgene

Wie in der Abbildung 2 dargestellt wurde, waren die Gene für Virulenzfaktoren insgesamt prävalenter als diejenigen der Resistenzfaktoren. Die klassischen Toxine, in Abbildung 2A gezeigt, waren in beiden Regionen in der Regel ohne statistisch signifikanten Unterschied aufgetreten. Einzige Ausnahme war das vermehrte Vorkommen von Exfoliativtoxin A in Ifakara (1,5% vs. 6,5%). Enterotoxin G war als häufigstes dieser Toxine nur in knapp der Hälfte aller Isolate, auch auf die Standorte bezogen, vertreten. In mehr als 25% der Isolate beider Standorte vertreten waren die Gene für Enterotoxin A, Enterotoxin G, Enterotoxin I, Enterotoxin M, Enterotoxin N, Enterotoxin U sowie das *egc*-Cluster. Die Prävalenz der übrigen Gene lag in beiden Standorten unter 15%.

Bei insgesamt hoher Prävalenz der Virulenzgene in Abbildung 2B in beiden Standorten, bildeten die Gene für die epidermalen Zelldifferenzierungsinhibitoren *edin A-C*, das bovine Leukozidin *lukM/lukF-P83* und das untruncated-Hämolyisin B sowie der *ACME*-Lokus eine Ausnahme mit einer Prävalenz unter 15% in beiden Standorten. Die restlichen Virulenzgene, darunter die Leukozidine, Hämolyisine und Proteasen, wurden in der Regel in mehr als 50% der Isolate gefunden. Sonderfälle waren die Gene der Serinprotease E, *spIE*, mit einer Prävalenz von 47,5% und PVL mit nur 20,25%. Besonders auffallend war auch die Verteilung von PVL, welches signifikant häufiger in Isolaten aus Tansania vorkam (3% vs. 37,5%). Leukocidin *lukD* (61% vs. 73,5%), Leukocidin *lukE* (55% vs. 77%) und das Gen für das Leukocidin/Hämolyisin Toxin Family Protein, *lukY-var 1* (77% vs. 89,5%), waren in tansanischen Proben vermehrt aufgetreten. Deutlich erkennbar bestanden die unterschiedlichen Prävalenzen der Serin Proteasen, wobei die Gene der Serin Proteasen *spIA* (61% vs. 71%) und *spIB* (61,5% vs. 81%) in afrikanischen Proben und die der Serin Protease *spIE* (54% vs. 41%) in deutschen Proben vermehrt zu finden war. Die Gene für die Staphylokinase *sak* (74,5% vs. 86,5%), den Staphylokokken-Komplement-Inhibitor *scn* (93% vs. 99,5%) und den Immunevasionsfaktor *mprF* (85% vs. 97%) kamen mehr in den afrikanischen Isolaten vor.

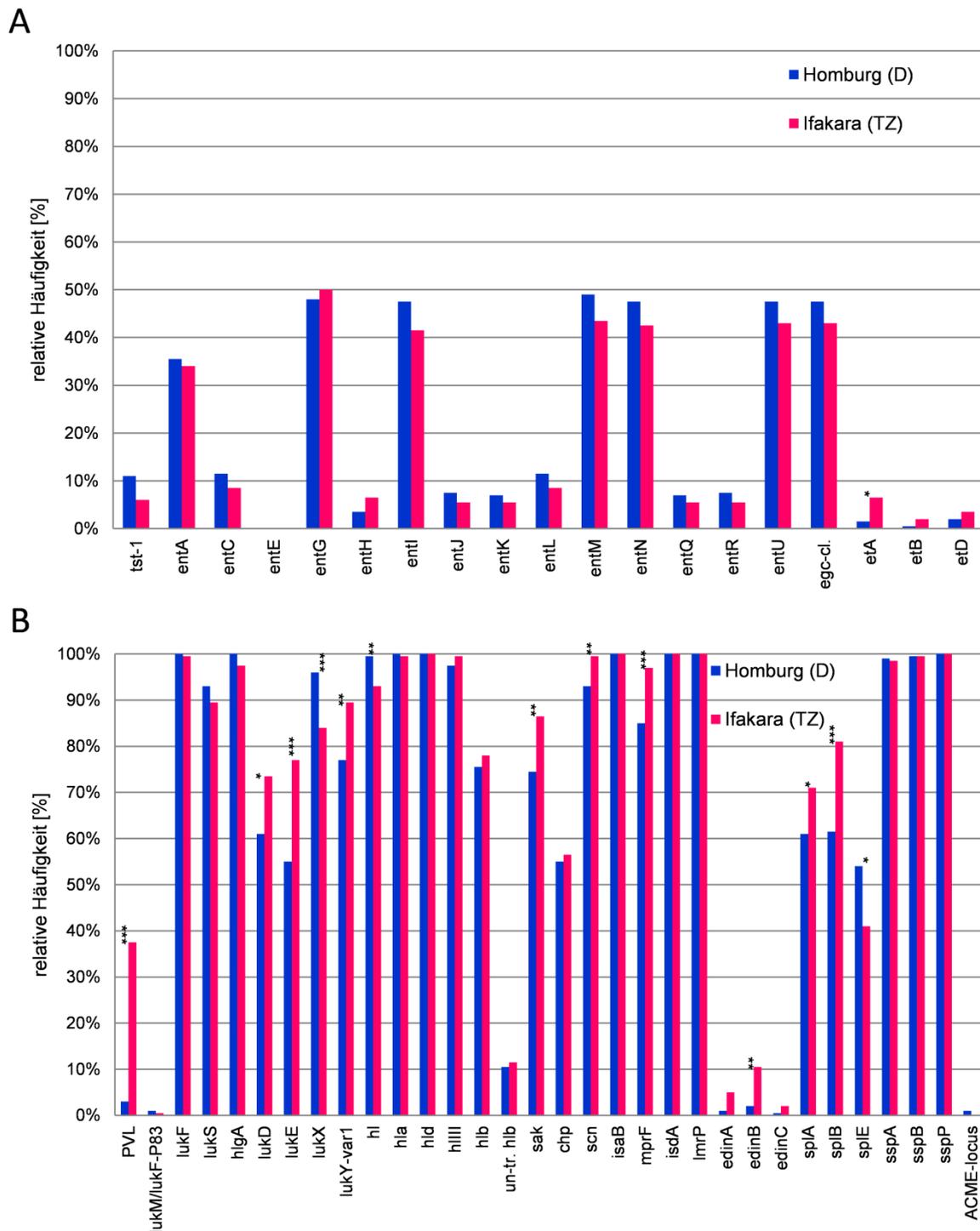


Abbildung 2: Relative Häufigkeit der Gene für klassische Toxine (A) und weitere Virulenzfaktoren (B) in Homburg und Ifakara. Die statistische Untersuchung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

5.2.3 Accessory Gene Regulator-Typen

Wie in Abbildung 3 gezeigt, entsprachen in beiden Standorten die globalen Regulationsfaktoren des *agr*-Systems in ~50% der Isolate dem Typ 1. Unterschiedliche Prävalenzen in den Regionen bestanden bei den Typen 3 und 4 mit eindeutiger Neigung zu afrikanischen Isolaten und für Typ 2 mit dem vermehrtem Auftreten in deutschen Isolaten.

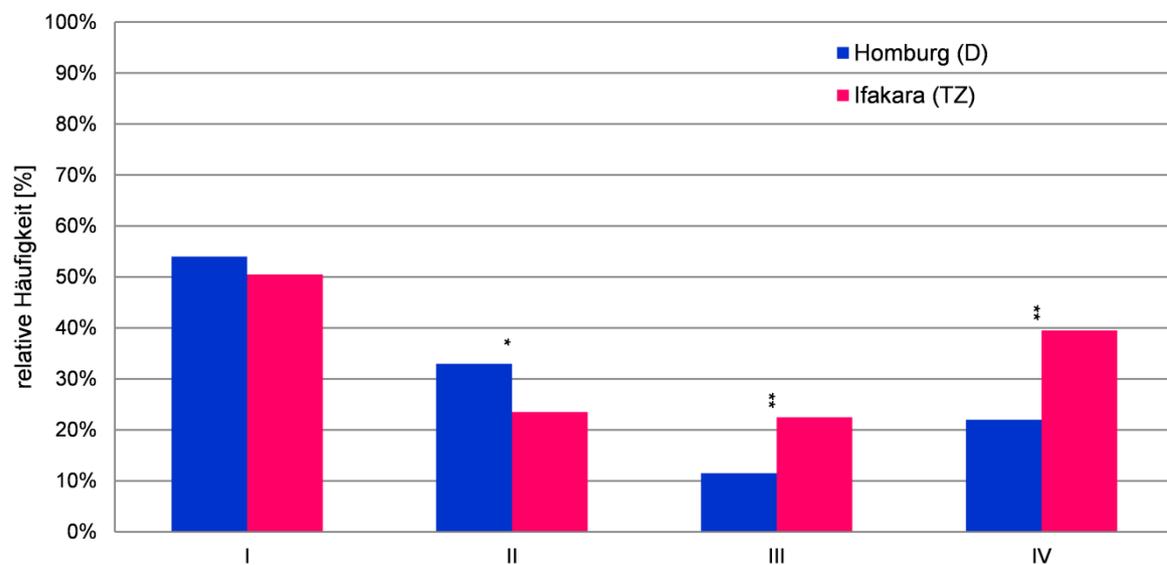


Abbildung 3: Relative Häufigkeit der vier verschiedenen Genregulator Typen (accessory gene regulator) in Homburg und Ifakara. Die statistische Untersuchung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

5.2.4 Kapsel- und Biofilmgene

Der häufigste Kapseltyp war Typ 8 mit einer Prävalenz von 64% in Homburg und 66% in Ifakara, der zweithäufigste Typ 5 (Abbildung 4). Vernachlässigend selten war Typ 1 vorhanden. Zwischen beiden Regionen bestanden keine nennenswerten Unterschiede. Wie in Abbildung 4 demonstriert wurde, waren die Gene zur Bildung des Biofilms bei annähernd allen Isolaten vorhanden. Das Interzelluläre Adhäsionsprotein *icaC* war mit 100% vs. 91% in afrikanischen Isolaten etwas seltener zu finden.

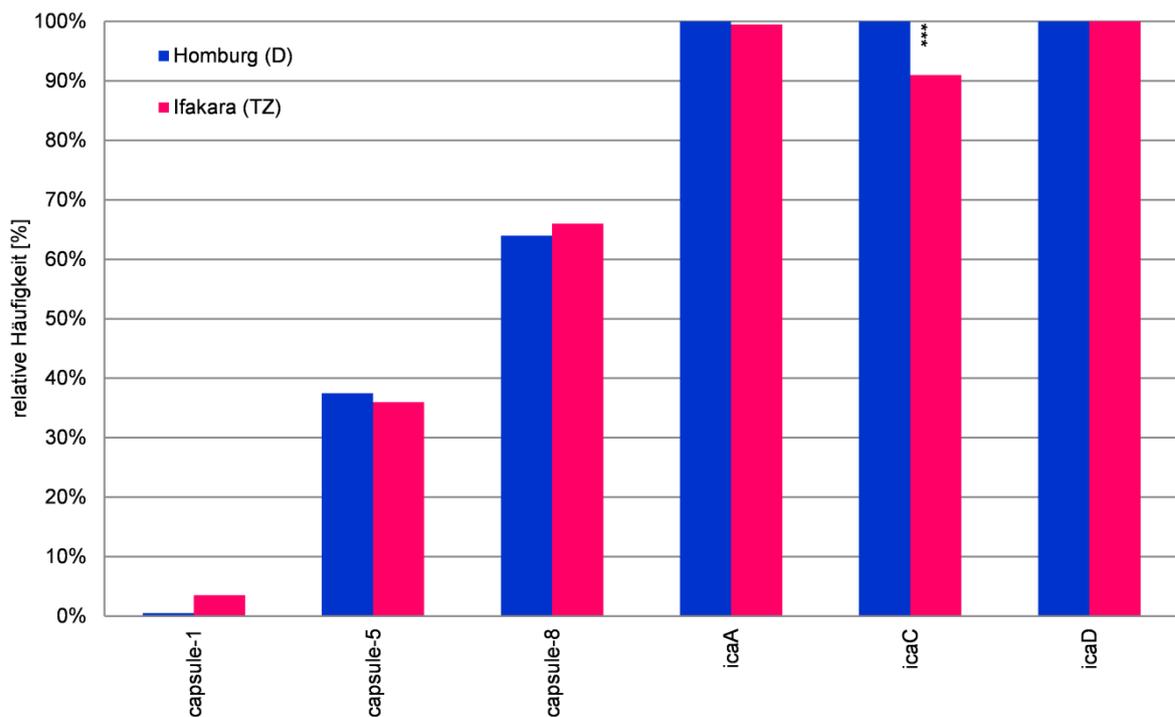


Abbildung 4: Relative Häufigkeit der Kapseltypen und Gene für den Biofilm in Homburg und Ifakara. Die statistische Untersuchung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

5.2.5 Adhäsionsgene

Bei insgesamt sehr hoher Prävalenz der Adhäsionsgene in beiden Regionen fanden sich geringe statistisch signifikante Unterschiede für Gene des Bone-Sialoprotein-Bindungsproteins *bbp* (85,5% vs. 92,5%), des Fibrinogen-Bindungsproteins *fib* (72% vs. 82,5%) und des van-Willebrand-Faktor-Bindungsproteins *vwb* (89,5% vs. 97%) mit vermehrtem Vorkommen in afrikanischen Isolaten. In deutschen Isolaten häufiger nachgewiesen wurden die Gene *map* (96,5% vs. 88,5%) und *sdrC* (99,5% vs 92,5%). Nahezu alle Isolate enthielten die Gene für die Clumpingfaktoren *clfA* und *clfB*, für Zellwand- und Zelloberfläche-assoziierte Bindungsproteine, wie *ebh* und *ebpS*, für die Enolase *eno* und für das Fibronectin-Bindungsprotein A *fnbA*.

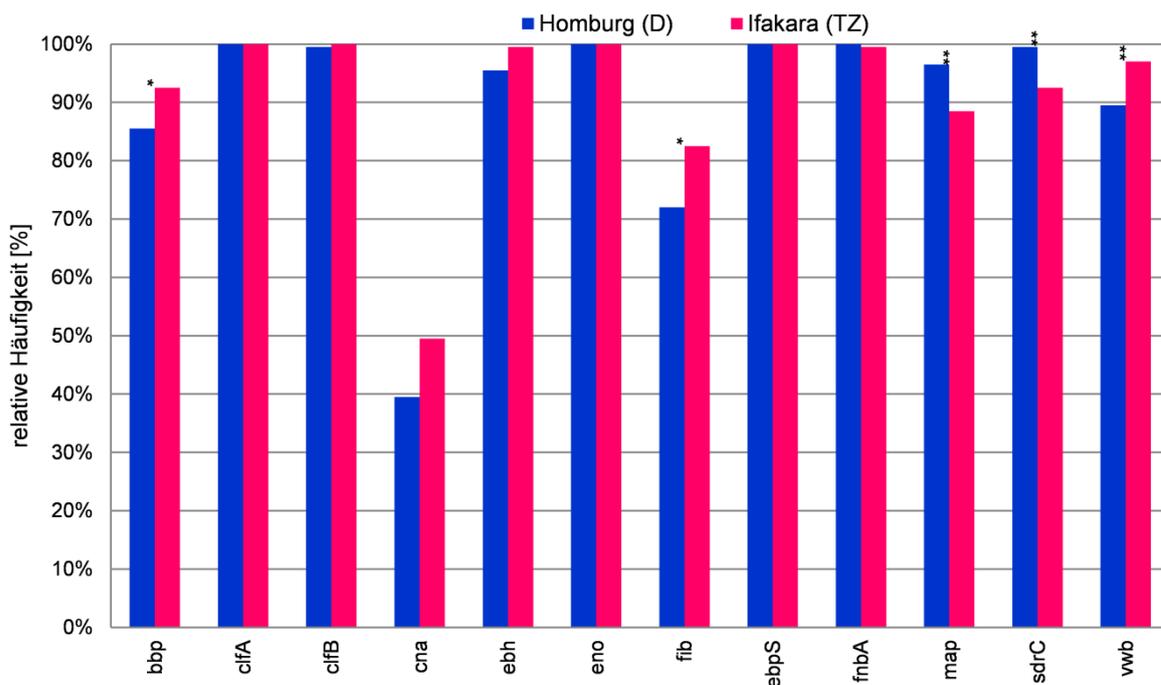


Abbildung 5: Relative Häufigkeit der Gene für Adhäsionsfaktoren in Homburg und Ifakara. Die statistische Untersuchung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

5.2.6 Superantigen- und Enterotoxin-ähnliche Gene

Die Gene für die verschiedenen Superantigen- und Enterotoxin-ähnlichen Toxine waren ebenfalls bei einem großen Anteil aller Isolate vertreten, wobei die afrikanischen Isolate häufiger stärker mit diesen ausgestattet waren als die deutschen Isolate. Wie in Abbildung 6 demonstriert wurde, ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede für die Gene *set8/ss13*, *set3/ss15*, *set21/ss16*, *set12/ss18*, *set5/ss19*, *setB1*, *setB2* und *setB3*.

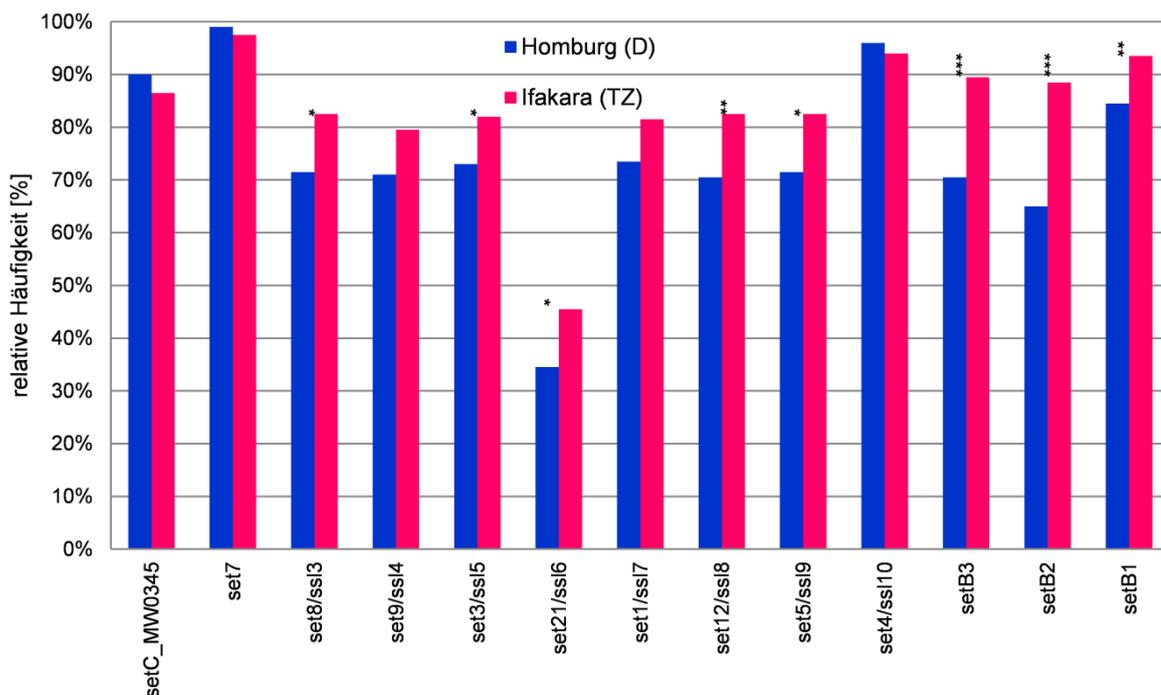


Abbildung 6: Relative Häufigkeit der Superantigen-like und Enterotoxin-like Gene in Homburg und Ifakara. Die statistische Untersuchung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test:

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

5.3 Clonal Complex-Analyse

Unter den 400 untersuchten Isolaten wurden 24 verschiedene klonale Komplexe (CC) detektiert. Nur ein Isolat ließ sich mithilfe des Mikroarrays keinem der aktuell bekannten klonalen Komplexe zuordnen („none“).

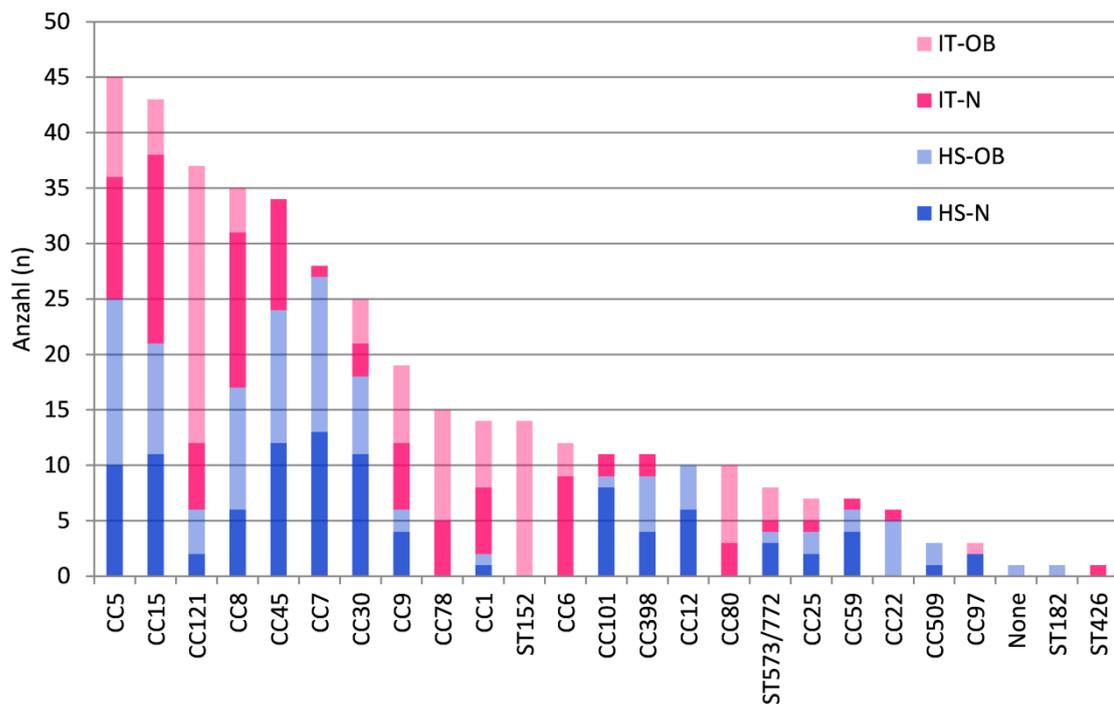


Abbildung 7: Absolute Anzahl der klonalen Komplexe mit der geografischen Unterteilung in Homburg (HS) und Ifakara (IT) und der Einteilung in kolonisierende (N) und invasive (OB) Stämme.

Besonders häufig nachgewiesen wurden CC5 (11,25%), CC15 (10,75%) und CC121 (9,25%), s. Abbildung 7.

In Homburg waren CC7 (13,5%), CC5 (12,5%) und CC45 (12%) am häufigsten, wohingegen in Ifakara CC121 (15,5%), CC15 (11%) und CC5 (10%) dominierten (Abb. 7 und 8).

Einzig in Homburg vorgekommen waren CC12, CC509 und ST182 (und none), nur in Afrika zu finden waren CC78, ST152, CC6, CC80 und ST426 (Abb. 7, 8 und 9).

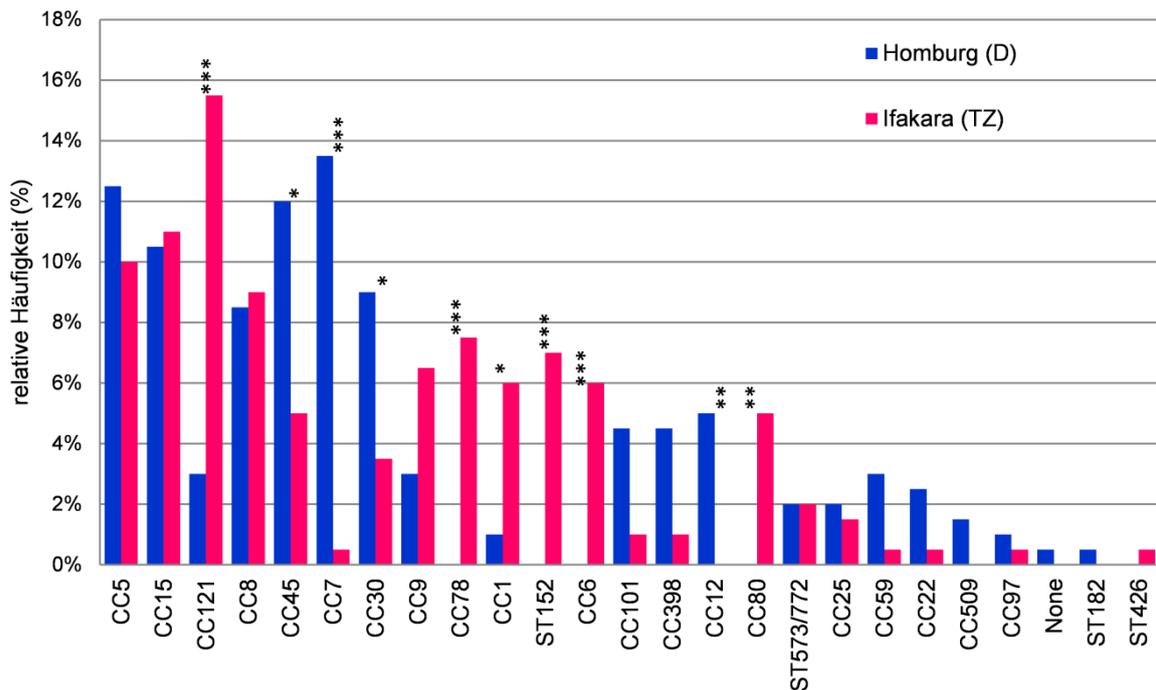


Abbildung 8: Relative Häufigkeit der klonalen Komplexe im Vergleich der beiden geografischen Regionen Homburg und Ifakara. Die statistische Untersuchung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Der Vergleich der beiden Standorte in Abbildung 8 zeigte einige deutliche statistische Unterschiede bezüglich der Häufigkeit der einzelnen klonalen Komplexe.

Statistisch signifikant häufiger in afrikanischen Isolaten gefunden wurden die klonalen Komplexe CC121 (3% in Homburg vs. 15,5% in Ifakara), CC78 (0% vs. 7,5%), ST152 (0% vs. 7%), CC6 (0% vs. 6%), CC80 (0% vs. 5%) und CC1 (1% vs. 6%).

Ebenso zeigte sich ein statistisch signifikant erhöhtes Vorkommen der klonalen Komplexe CC45 (12% vs. 5%), CC7 (13,5% vs. 0,5%), CC30 (9% vs. 3,5%) und CC12 (5% vs. 0%) in Deutschland.

CC5 war in den vier Subgruppen HS-N, HS-OB, IT-N und IT-OB mit Prävalenzen zwischen 9 und 15% relativ gleichmäßig vertreten (Abb. 7). Der klonale Komplex CC15 verteilte sich auf die beiden Standorte ebenfalls ausgeglichen (10,5% in

Homburg vs. 11% in Ifakara, Abb. 8), jedoch sah man ein vermehrtes Auftreten in den nasalen Isolaten (14%) im Vergleich zu den klinischen Isolaten (7,5%) (Abb. 7). Der in Tansania häufigste klonale Komplex CC121 war mit 14,5% der häufigste CC in den klinischen Isolaten. Bei dem in Homburg am häufigsten nachgewiesenen klonalen Komplex CC7 war die Verteilung auf nasale und klinische Isolate gleich mit 7% (Abb. 7 und 9)

In Abbildung 9 (A/B) wurde das Auftreten der klonalen Komplexe in den beiden Isolatquellen, Kommensale oder invasives Isolat, sowohl für Homburg (A) als auch für Ifakara (B), dargestellt.

In der Homburger Population überwog eine relativ ausgeglichene Verteilung unter den einzelnen Komplexen. Lediglich CC101 ragte, als statistisch signifikant häufiger in nasalen Isolaten (8% in kommensalen vs. 1% in invasiven Isolaten) vorkommender Komplex, hervor.

In der afrikanischen Population zeichneten sich mehr statistisch signifikante Unterschiede ab. Besonders ST152 wurde ausschließlich in invasiven afrikanischen Isolaten (14%) nachgewiesen. CC121 zeigte auch einen deutlichen Trend zur Invasivität (6% vs. 25%). Vorwiegend Kommensalen waren CC15 (17% vs. 5%), CC8 (14% vs. 4%) und CC45 (10% vs. 0%).

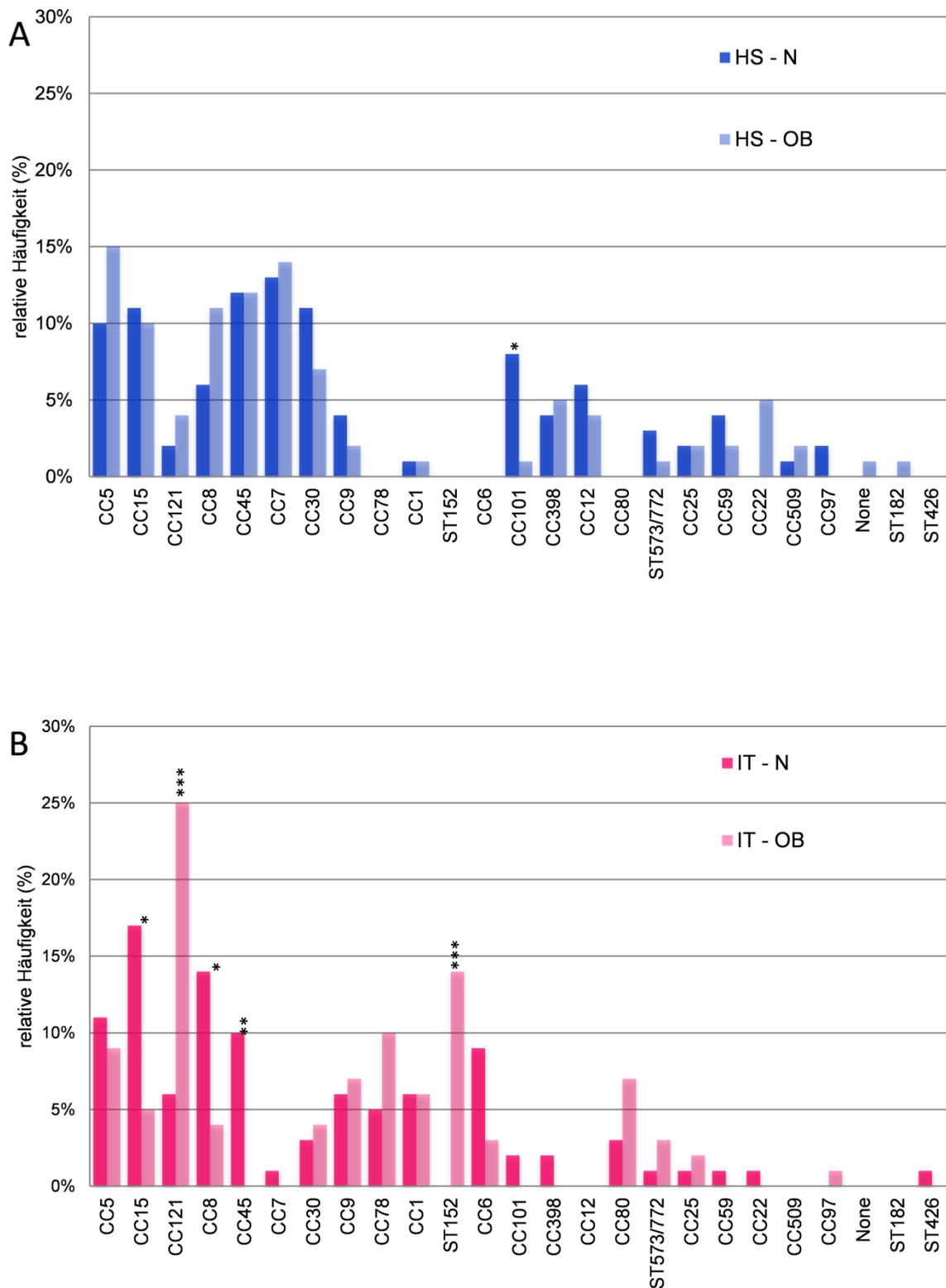


Abbildung 9: Relative Häufigkeit der verschiedenen klonalen Komplexe unterteilt in kolonisierende (N) und invasive (OB) Isolate in den Standorten Homburg (A) und Ifakara (B). Die statistische Untersuchung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

5.3.1 Genrepertoire in den klonalen Komplexen

5.3.1.1 Resistenzgene

Für die Gene der Betalaktamaseresistenz *blaZ*, der Tetrazyklinresistenz *tetK* und Makrolid-/Clindamycin-Resistenz *ermA* und *ermC* wurde eine Analyse zur Verteilung in den einzelnen klonalen Komplexen durchgeführt.

Tabelle 3: Relative Häufigkeit von *blaZ* in den klonalen Komplexen in den kommensalen und invasiven Isolaten aus Homburg und Ifakara.

<i>blaZ</i>	Homburg-nasal	Homburg-invasiv	Ifakara-nasal	Ifakara-invasiv
CC5	30%	80%	100%	100%
CC15	100%	60%	100%	60%
CC121	ag	100%	100%	100%
CC8	83%	73%	100%	100%
CC45	33%	58%	90%	nn
CC7	46%	64%	ag	nn
CC30	100%	100%	100%	100%
CC9	100%	ag	83%	100%
CC78	nn	nn	100%	100%
CC1	ag	ag	83%	100%
ST152	nn	nn	nn	100%
CC6	nn	nn	89%	100%
CC101	0%	ag	ag	nn
CC398	0%	20%	ag	nn
CC12	0%	25%	nn	nn
CC80	nn	nn	67%	71%
ST573/772	100%	ag	ag	100%
CC59	50%	ag	ag	nn
CC22	nn	80%	ag	nn

ag = ausgeschlossen, wenn Vorkommen des CC in der Subgruppe ≤ 3 . nn = nicht nachweisbar, wenn CC in dieser Subgruppe nicht nachgewiesen wurde.

Betrachtete man das Gesamtkollektiv, waren 312 (78%) aller untersuchten Proben *blaZ* positiv. Bis auf den einen, bisher nicht zuordenbaren klonalen Komplex, none, trugen alle anderen klonalen Komplexe in unterschiedlichen Häufigkeiten das Betalaktamaseresistenz-Gen. Die 122 in Homburg gefundenen Positiven (61%) verteilten sich auf alle dort gefundenen CC mit Ausnahme von CC101 und none. Die 190 Positiven aus Ifakara (95%) verteilten sich auf alle dort detektierten

CC. In Bezug auf die Isolateigenschaften als kolonisierende oder invasive Stämme ergab sich für die Betalaktamaseresistenz eine relativ ausgeglichene Verteilung bei 74,5% positiven Kommensalen und 81,5% positiven invasiven Isolaten. Wie in Tabelle 3 gezeigt wurde, gab es regionale Unterschiede der Ausstattung der Isolate mit Betalaktamaseresistenzgenen innerhalb der klonalen Komplexe. Der häufigste klonale Komplex CC5 war in den deutschen Nasenabstrichen nur zu 30% und in den deutschen invasiven Abstrichen nur zu 80% mit dem *blaZ*-Gen ausgestattet, wohingegen in Tansania beide Gruppen zu 100% das *blaZ*-Gen enthielten. Besonders aufgefallen war, dass CC121 und CC30 in allen vier Gruppen zu 100% das *blaZ*-Gen trugen. In den klonalen Komplexen der klinischen Isolate aus Afrika waren häufiger alle mit *blaZ* ausgestattet als dies in Deutschland der Fall war. Isolate aus klonalen Komplexen, die in Homburg gar nicht nachgewiesen wurden, wie CC78, ST152, CC6 und CC80, hatten nahezu alle das *blaZ*-Gen. Es gab aber auch Isolate, deren klonale Komplexe in Afrika nicht oder nur wenig vertreten waren, die in Deutschland ebenfalls nur zu einem geringen Anteil das *blaZ*-Gen enthielten, wie CC101, CC398 und CC12. Wie durch die Farbgebung der Tabelle 3 verdeutlicht wurde, waren die klonalen Komplexe aus Afrika deutlich häufiger mit der Betalaktamaseresistenz ausgestattet als die der deutschen Isolate.

Tabelle 4: Relative Häufigkeit von *tetK* in den klonalen Komplexen in den kommensalen und invasiven Isolaten aus Homburg und Ifakara.

<i>tetK</i>	Homburg-nasal	Homburg-invasiv	Ifakara-nasal	Ifakara-invasiv
CC5	0%	7%	36%	33%
CC15	0%	10%	6%	0%
CC121	ag	0%	17%	16%
CC8	0%	0%	50%	75%
CC45	0%	0%	10%	nn
CC7	0%	14%	ag	nn
CC30	0%	0%	0%	0%
CC9	0%	ag	50%	29%
CC78	nn	nn	80%	60%
CC1	ag	ag	0%	17%
ST152	nn	nn	nn	64%
CC6	nn	nn	0%	0%
CC101	0%	ag	ag	nn
CC398	0%	0%	ag	nn
CC12	0%	0%	nn	nn
CC80	nn	nn	33%	29%
ST573/772	0%	ag	ag	33%
CC59	0%	ag	ag	nn
CC22	nn	0%	ag	nn

ag = ausgeschlossen, wenn Vorkommen des CC in der Subgruppe ≤ 3 . nn = nicht nachweisbar, wenn CC in dieser Subgruppe nicht nachgewiesen wurde.

15% aller Isolate, 11,5% der nasalen und 18,5% der invasiven Isolate, trugen das *tetK*-Gen. In Homburg existierten nur 4 *tetK*-positive Isolate, 28% der Isolate aus Tansania waren mit dem *tetK*-Gen ausgestattet, wobei die klonalen Komplexe CC78, CC8 und ST152 mehr als die Hälfte dieser ausmachten. Auch hier waren wieder die klonalen Komplexe aufgefallen, die (fast) nur in den afrikanischen Isolaten vorkamen, wie CC78, ST152 und CC80, mit eindeutig vermehrter Tetrazyklinresistenz (Tabelle 4). Wie in Tabelle 4 gezeigt wurde, ergaben sich für den klonalen Komplex CC8 eindeutige regionale Unterschiede in der Ausstattung mit dem *tetK*-Gen, in Homburg mit 0%, dagegen in der Hälfte der afrikanischen Kommensalen und zu 75% in den invasiven afrikanischen Isolaten. Im Gegensatz zur Betalaktamaseresistenz enthielten der isoliert in Afrika gefundene klonale Komplex CC6 und der in allen vier Gruppen vertretene klonale Komplex CC30 keine Tetrazyklinresistenz.

Tabelle 5: Relative Häufigkeit von *ermA* in den klonalen Komplexen in den kommensalen und invasiven Isolaten aus Homburg und Ifakara.

<i>ermA</i>	Homburg-nasal	Homburg-invasiv	Ifakara-nasal	Ifakara-invasiv
CC5	20%	27%	0%	0%
CC15	0%	0%	0%	0%
CC121	ag	0%	0%	0%
CC8	0%	9%	0%	0%
CC45	0%	8%	0%	nn
CC7	8%	7%	ag	nn
CC30	9%	14%	0%	0%
CC9	25%	ag	0%	0%
CC78	nn	nn	0%	0%
CC1	ag	ag	0%	0%
ST152	nn	nn	nn	0%
CC6	nn	nn	0%	0%
CC101	0%	ag	ag	nn
CC398	0%	0%	ag	nn
CC12	17%	50%	nn	nn
CC80	nn	nn	0%	0%
ST573/772	0%	ag	ag	0%
CC59	0%	ag	ag	nn
CC22	nn	20%	ag	nn

ag = ausgeschlossen, wenn Vorkommen des CC in der Subgruppe ≤ 3 . nn = nicht nachweisbar, wenn CC in dieser Subgruppe nicht nachgewiesen wurde.

Die Verteilung der Gene für die Makrolid-/Clindamycin-Resistenz *ermA* und *ermC* wurde in den beiden Tabellen (5 und 6) aufgelistet. In Tansania existierten keine Isolate mit dem *ermA*-Gen, in Deutschland verteilten sich die Gene auf ca. ein Drittel nasale (6% in Homburg), zwei Drittel klinische Isolate (11% in Homburg).

Tabelle 6: Relative Häufigkeit von *ermC* in den klonalen Komplexen in den kommensalen und invasiven Isolaten aus Homburg und Ifakara.

<i>ermC</i>	Homburg-nasal	Homburg-invasiv	Ifakara-nasal	Ifakara-invasiv
CC5	10%	13%	64%	44%
CC15	0%	10%	18%	0%
CC121	ag	0%	33%	4%
CC8	0%	18%	0%	25%
CC45	8%	17%	0%	nn
CC7	0%	14%	ag	nn
CC30	0%	0%	0%	0%
CC9	0%	ag	0%	14%
CC78	nn	nn	0%	10%
CC1	ag	ag	0%	17%
ST152	nn	nn	nn	50%
CC6	nn	nn	0%	0%
CC101	0%	ag	ag	nn
CC398	0%	0%	ag	nn
CC12	17%	0%	nn	nn
CC80	nn	nn	0%	14%
ST573/772	67%	ag	ag	33%
CC59	0%	ag	ag	nn
CC22	nn	40%	ag	nn

ag = ausgeschlossen, wenn Vorkommen des CC in der Subgruppe ≤ 3 . nn = nicht nachweisbar, wenn CC in dieser Subgruppe nicht nachgewiesen wurde.

ErmC war wiederum vermehrt in den afrikanischen Isolaten aufgetreten, besonders in nasalen Isolaten der klonalen Komplexe CC5, CC15 und CC121. Insgesamt waren aber erneut mehr klinische (16%) als nasale Isolate (9,5%) mit *ermC* gefunden worden.

Zusammenfassend konnten deutliche regionale Unterschiede, z. B. CC5 und CC8, aber auch Gemeinsamkeiten, z. B. CC30, in der Ausstattung einiger klonaler Komplexe mit Genen für Resistenzfaktoren festgestellt werden. Die vermehrt in Tansania vertretenen klonalen Komplexe CC121 und ST152 waren vergleichsweise häufig mit Resistenzgenen ausgestattet.

5.3.1.2 Virulenzgene

Analog zu den Resistenzgenen wurden Virulenzgene ausgewählt, diese waren das Panton-Valentine-Leukocidin PVL, die Serinproteasen *sp/B* und *sp/E*.

Tabelle 7: Relative Häufigkeit von PVL in den klonalen Komplexen in den kommensalen und invasiven Isolaten aus Homburg und Ifakara.

PVL	Homburg-nasal	Homburg-invasiv	Ifakara-nasal	Ifakara-invasiv
CC5	0%	0%	9%	44%
CC15	0%	10%	0%	0%
CC121	ag	75%	17%	96%
CC8	0%	0%	0%	0%
CC45	0%	0%	0%	nn
CC7	0%	0%	ag	nn
CC30	0%	14%	67%	100%
CC9	0%	ag	0%	0%
CC78	nn	nn	60%	90%
CC1	ag	ag	0%	0%
ST152	nn	nn	nn	100%
CC6	nn	nn	0%	0%
CC101	0%	ag	ag	nn
CC398	0%	0%	ag	nn
CC12	0%	0%	nn	nn
CC80	nn	nn	100%	86%
ST573/772	0%	ag	ag	100%
CC59	0%	ag	ag	nn
CC22	nn	20%	ag	nn

ag = ausgeschlossen, wenn Vorkommen des CC in der Subgruppe ≤ 3 . nn = nicht nachweisbar, wenn CC in dieser Subgruppe nicht nachgewiesen wurde.

Circa ein Fünftel aller Proben waren PVL positiv (5,5% kommensale vs. 35% invasive Isolate). Jedoch verteilten sich die Positiven nur auf zehn der 25 CCs. Alle Vertreter von ST152 trugen das PVL-Gen. CC80 war mit 90%, CC78 mit 80% und CC121 mit 76% PVL positiv, insgesamt bildeten diese drei klonalen Komplexe fast zwei Drittel der detektierten PVL-Gene. In Homburg wurden nur sechs PVL gefunden, diese verteilten sich einzig in den klinischen Isolaten auf CC121, CC15, CC22 und CC30. In Ifakara wurden 75 PVL ermittelt, die sich zu acht verschiedenen CCs (CC121, CC30, CC5, CC59, CC78, CC80, ST152, ST573/772) zuordnen ließen. Wie in Tabelle 7 verdeutlicht wurde, zeigte die Analyse der Verteilung des PVL-Gens unter den klonalen Komplexen eine Tendenz zu klinischen und auch zu afrikanischen Isolaten. Erneut

hervorgestochen waren die isoliert in Afrika gefundenen klonalen Komplexe CC78, ST152 und CC80. Ähnliche regionale Verteilung wurden für CC121 und CC8 gefunden. Deutliche Unterschiede wurden im klonalen Komplex CC30, der in Isolaten aus Tansania, insbesondere in deren Wundabstriche, besonders häufig mit PVL ausgestattet war, nachgewiesen.

Tabelle 8: Relative Häufigkeit von *spIB* in den klonalen Komplexen in den kommensalen und invasiven Isolaten aus Homburg und Ifakara.

<i>spIB</i>	Homburg-nasal	Homburg-invasiv	Ifakara-nasal	Ifakara-invasiv
CC5	100%	100%	100%	100%
CC15	100%	100%	100%	100%
CC121	ag	100%	100%	100%
CC8	100%	91%	100%	100%
CC45	0%	0%	0%	nn
CC7	100%	100%	ag	nn
CC30	0%	0%	0%	0%
CC9	0%	ag	83%	100%
CC78	nn	nn	100%	100%
CC1	ag	ag	100%	100%
ST152	nn	nn	nn	0%
CC6	nn	nn	100%	100%
CC101	100%	ag	ag	nn
CC398	0%	20%	ag	nn
CC12	100%	100%	nn	nn
CC80	nn	nn	100%	100%
ST573/772	0%	ag	ag	0%
CC59	0%	ag	ag	nn
CC22	nn	0%	ag	nn

ag = ausgeschlossen, wenn Vorkommen des CC in der Subgruppe ≤ 3 . nn = nicht nachweisbar, wenn CC in dieser Subgruppe nicht nachgewiesen wurde.

Die Serinprotease *spIB* war in 71,25% aller Isolate vorhanden. In den häufigen klonalen Komplexen CC5, CC15, CC121 und CC8 war die Verteilung gleich mit einer Prävalenz von meist 100%. Die CC30 und CC45 trugen in keiner Subgruppe *spIB*. Erneut trugen die isoliert in Afrika gefundenen klonalen Komplexe CC78, CC6 und CC80 immer das *spIB*-Gen. Wie in der Tabelle 8 demonstriert wurde, waren entweder nahezu alle Isolate einzelner klonaler Komplexe mit *spIB* ausgestattet oder keiner im jeweiligen Komplex. Ausnahmen bildeten CC8 mit 91% (HS-OB), CC9 mit 83% (IT-N) und C398 mit 20% (HS-OB).

Tabelle 9: Relative Häufigkeit von *sp/E* in den klonalen Komplexen in den kommensalen und invasiven Isolaten aus Homburg und Ifakara.

<i>sp/E</i>	Homburg-nasal	Homburg-invasiv	Ifakara-nasal	Ifakara-invasiv
CC5	0%	7%	0%	0%
CC15	91%	100%	100%	100%
CC121	ag	0%	0%	0%
CC8	100%	82%	79%	100%
CC45	0%	0%	10%	nn
CC7	100%	100%	ag	nn
CC30	100%	100%	100%	100%
CC9	0%	ag	83%	100%
CC78	nn	nn	0%	0%
CC1	ag	ag	50%	33%
ST152	nn	nn	nn	0%
CC6	nn	nn	67%	100%
CC101	100%	ag	ag	nn
CC398	0%	0%	ag	nn
CC12	100%	100%	nn	nn
CC80	nn	nn	0%	14%
ST573/772	0%	ag	ag	0%
CC59	0%	ag	ag	nn
CC22	nn	0%	ag	nn

ag = ausgeschlossen, wenn Vorkommen des CC in der Subgruppe ≤ 3 . nn = nicht nachweisbar, wenn CC in dieser Subgruppe nicht nachgewiesen wurde.

Das in 47,5% der Isolate gefundene Gen der Serinprotease *sp/E* war häufiger in den Homburger Isolaten, dort auch vermehrt in den kommensalen Isolaten, zu finden. Der häufigste klonale Komplex CC5 enthielt nur einmal das *sp/E*-Gen. Auch der besonders in den invasiven Isolaten vorkommende CC121 enthielt kein *sp/E*. Wiederum enthielten CC15, CC8 und CC30 zu einem großen Teil *sp/E*. Wie auch schon für *sp/B* enthielten die in Deutschland prävalenteren klonalen Komplexe CC7, CC101 und CC12 immer die Gene der Serinprotease E. Im Gegensatz zu *sp/B* war *sp/E* in den isoliert in Afrika gefundenen CC78 und CC80 deutlich seltener zu finden - lediglich in CC6 in 75% der Fälle.

Es zeigte sich zusammenfassend, dass die Virulenzgene zumeist in Abhängigkeit des klonalen Komplexes vorkamen. Die, häufig invasive Isolate enthaltenden, klonalen Komplexe CC121 und CC5 waren nicht immer mit allen Virulenzgenen ausgestattet. Hingegen trugen die häufig mit kommensalen Isolaten vertretenen klonalen Komplexe CC15 und CC45 einige Virulenzgene.

5.3.1.3 Adhäsionsgene

Analog zu den Resistenz- und Virulenzgenen wurden Gene für Adhäsionsproteine ausgewählt, diese sind das Bone Sialoprotein-Bindungsprotein *bbp* und das van-Willebrand-Faktor-Bindungsprotein *vwb*.

Tabelle 10: Relative Häufigkeit von *bbp* in den klonalen Komplexen in den kommensalen und invasiven Isolaten aus Homburg und Ifakara.

<i>bbp</i>	Homburg-nasal	Homburg-invasiv	Ifakara-nasal	Ifakara-invasiv
CC5	100%	87%	100%	100%
CC15	82%	90%	100%	100%
CC121	ag	100%	100%	100%
CC8	67%	100%	100%	100%
CC45	83%	100%	80%	nn
CC7	92%	100%	ag	nn
CC30	91%	86%	67%	100%
CC9	75%	ag	33%	29%
CC78	nn	nn	100%	100%
CC1	ag	ag	100%	100%
ST152	nn	nn	nn	93%
CC6	nn	nn	89%	100%
CC101	100%	ag	ag	nn
CC398	100%	100%	ag	nn
CC12	17%	25%	nn	nn
CC80	nn	nn	100%	100%
ST573/772	100%	ag	ag	100%
CC59	100%	ag	ag	nn
CC22	nn	80%	ag	nn

ag = ausgeschlossen, wenn Vorkommen des CC in der Subgruppe ≤ 3 . nn = nicht nachweisbar, wenn CC in dieser Subgruppe nicht nachgewiesen wurde.

Mit einer Prävalenz von 89% war *bbp* häufig vertreten. Wie in der Tabelle 10 dargestellt wurde, sind die klonalen Komplexe CC5, CC15, CC8 in Afrika zu 100% mit *bbp* ausgestattet, im Gegensatz dazu waren diese Komplexe in Deutschland seltener mit *bbp* ausgestattet ohne Tendenz zu nasalen oder klinischen Isolaten. Besonders in der Untergruppe der Homburger Abstriche gab es in den klonalen Komplexen keine eindeutige Neigung zu *bbp*, die Prävalenzen lagen zwischen 17% und 100%.

Tabelle 11: Relative Häufigkeit von *vwb* in den klonalen Komplexen in den kommensalen und invasiven Isolaten aus Homburg und Ifakara.

<i>vwb</i>	Homburg-nasal	Homburg-invasiv	Ifakara-nasal	Ifakara-invasiv
CC5	100%	100%	91%	100%
CC15	100%	100%	100%	100%
CC121	ag	100%	100%	100%
CC8	100%	100%	100%	100%
CC45	8%	17%	60%	nn
CC7	100%	100%	ag	nn
CC30	100%	100%	100%	100%
CC9	100%	ag	100%	100%
CC78	nn	nn	80%	100%
CC1	ag	ag	100%	100%
ST152	nn	nn	nn	100%
CC6	nn	nn	100%	100%
CC101	100%	ag	ag	nn
CC398	100%	100%	ag	nn
CC12	100%	100%	nn	nn
CC80	nn	nn	100%	100%
ST573/772	100%	ag	ag	100%
CC59	100%	ag	ag	nn
CC22	nn	100%	ag	nn

ag = ausgeschlossen, wenn Vorkommen des CC in der Subgruppe ≤ 3 . nn = nicht nachweisbar, wenn CC in dieser Subgruppe nicht nachgewiesen wurde.

93,25% der Isolate enthielten das Gen des van-Willebrand-Faktor-Bindungsproteins *vwb*. Dementsprechend war die Verteilung relativ ausgeglichen mit häufig 100% in den einzelnen klonalen Komplexen. Jedoch fiel der am zweithäufigsten aus nasalen Isolaten bestehende klonale Komplex CC45, wie in Tabelle 11 dargestellt wurde, mit einer ungleichen Verteilung auf. Im Homburger CC45 nur dreimal vertreten, in Tansania nur in sechs Fällen.

Zusammenfassend waren auch hier regionale Unterschiede der Ausstattung der einzelnen klonalen Komplexe aufgefallen.

5.3.2 Hierarchische Clusteranalyse - CC5 und CC15

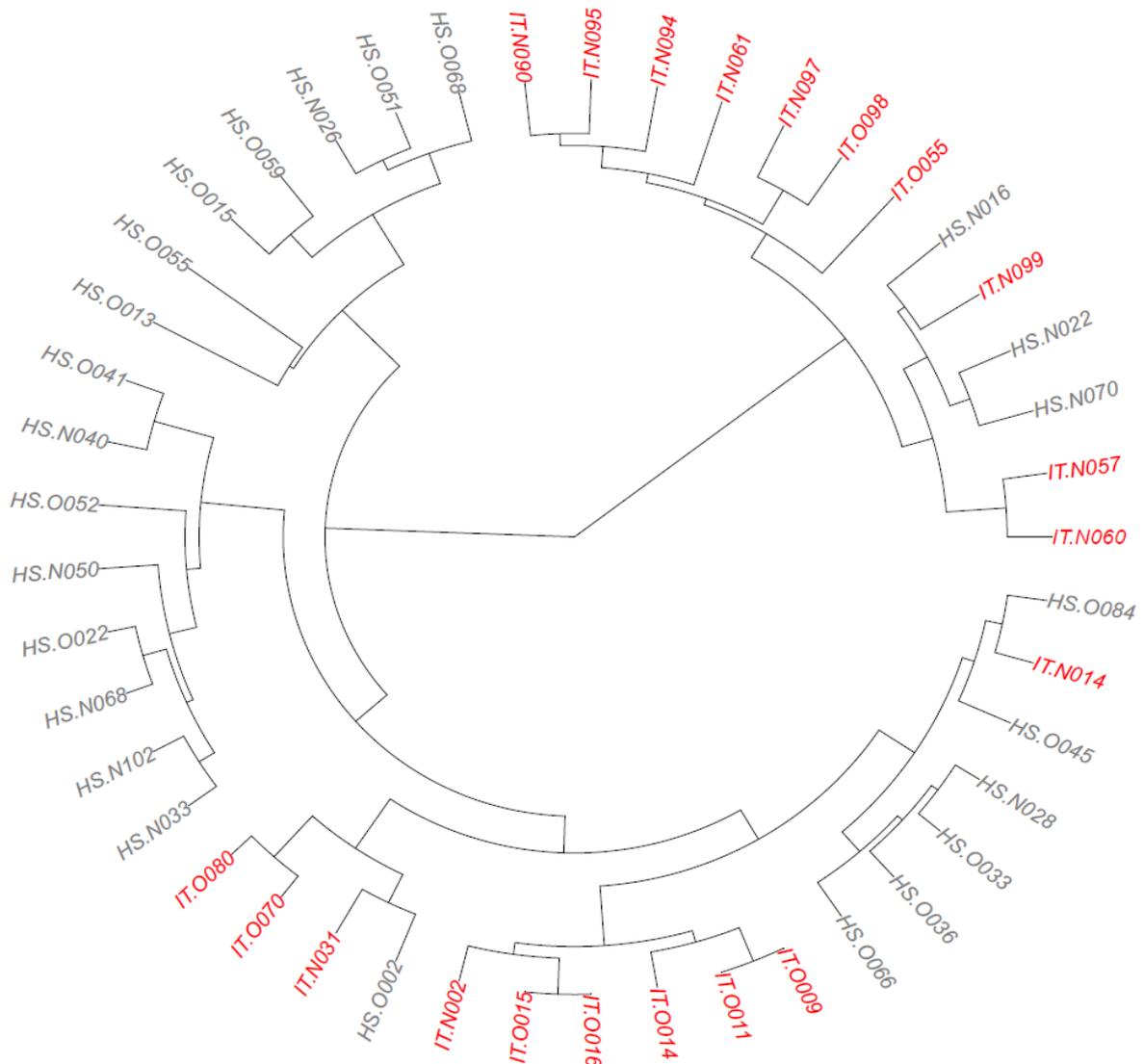


Abbildung 10: Subgruppenanalyse der Mikroarraydaten von CC5 mit hierarchischer agglomerativer Clusteranalyse. Die Isolate aus Homburg (HS) wurden grau, die Isolate aus Ifakara (IT) rot gekennzeichnet.

Innerhalb des klonalen Komplexes CC5 konnte man ein eindeutiges Clustern nach geografischem Ursprung erkennen. Innerhalb der Cluster konnte ebenfalls ein Clustern nach Isolaturprung, nasal und invasiv, nachgewiesen werden. Es zeigten sich viele einzelne, kleinere Cluster.

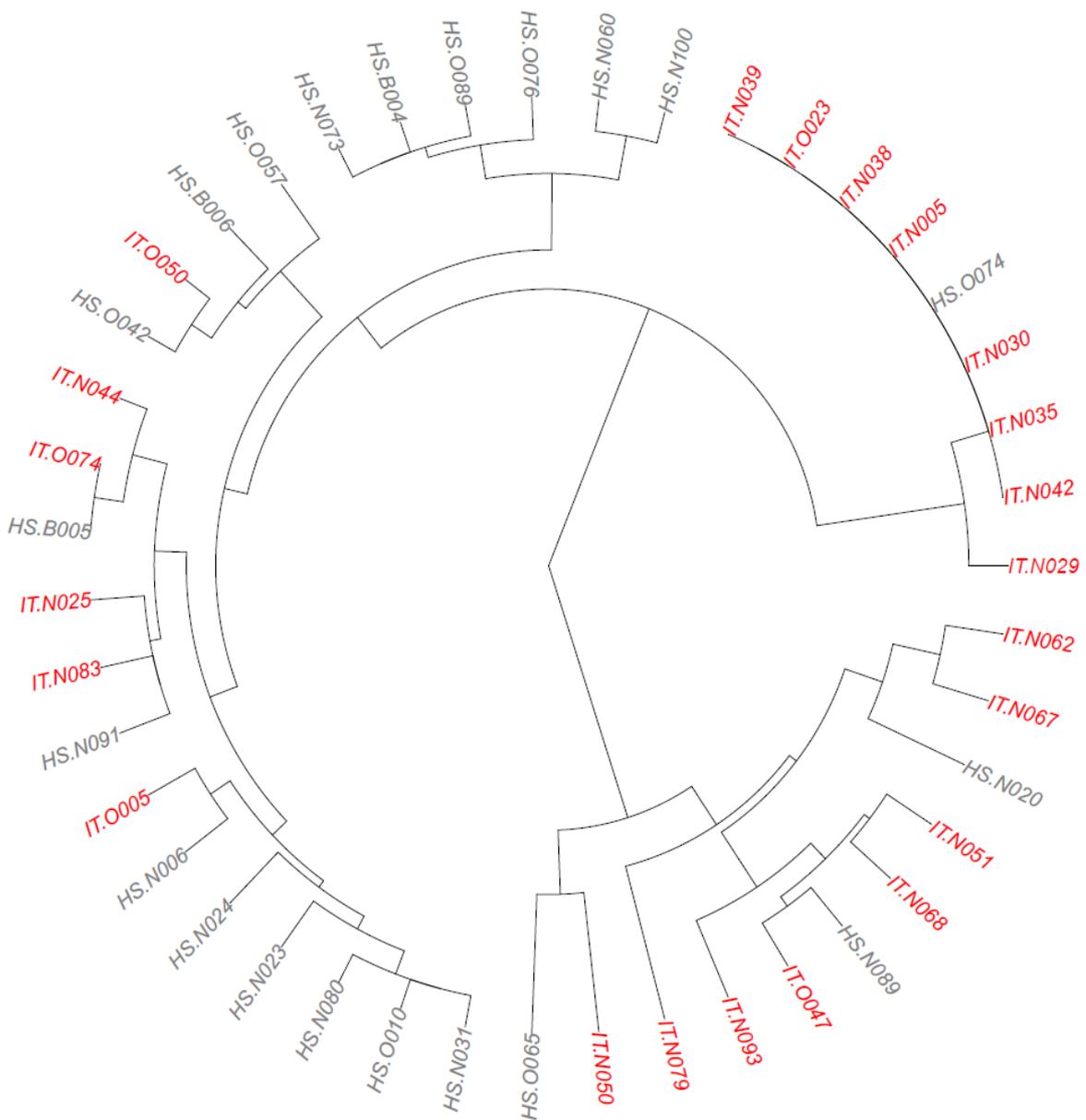


Abbildung 11: Subgruppenanalyse der Mikroarraydaten von CC15 mit hierarchischer agglomerativer Clusteranalyse. Die Isolate aus Homburg (HS) wurden grau, die Isolate aus Ifakara (IT) rot gekennzeichnet.

Innerhalb des klonalen Komplexes CC15 konnte man ebenfalls Clustern nach geografischem Ursprung, sowie mit wenigen Ausnahmen nach Isolatursprung, erkennen. Hier differenzierten sich ebenfalls viele einzelne, kleinere Cluster.

5.4 Hierarchische Clusteranalyse - global

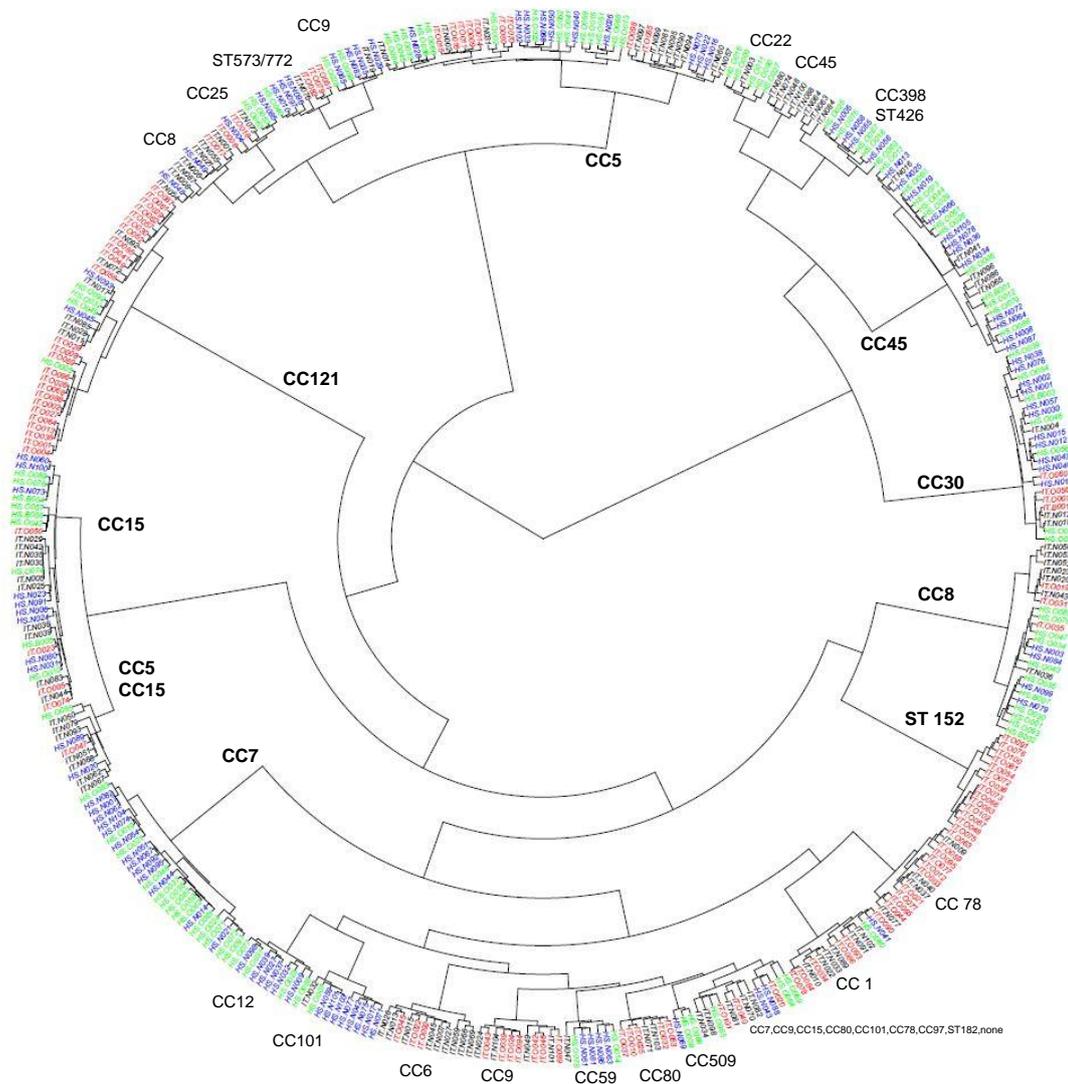


Abbildung 12: Analyse der Mikroarraydaten aller 400 Isolate via hierarchischer agglomerativer Clusteranalyse. HS-N wurden blau, HS-O/B grün, IT-N schwarz und IT-O/B rot gekennzeichnet.

Global betrachtet gab es, wie in Abbildung 12 gezeigt, eine ausgeglichene Verteilung. Die Untersuchung mittels der Clusteranalyse anhand der Mikroarraydaten stimmte bis auf wenige Ausnahmen mit der MLST-Zuordnung in klonale Komplexe überein. In den einzelnen Clustern der klonalen Komplexe konnte man auch ein weiteres Clustering erkennen.

Anhand des H-Baumes (Abb. 12) konnte man grob zwei Cluster erkennen, die sich beide in weitere viele kleine Cluster differenzierten.

Das Kleinere, bestehend aus 19,25% der Isolate (77 Isolate), wurde gebildet von den klonalen Komplexen CC22, CC45, CC398, ST426 und CC30. 73% dieses Clusters waren Isolate aus Homburg, welche sich relativ homogen verteilten. Nur 27% stammten aus Tansania, welche in der Regel zusammenclusterten.

Das größere Cluster, 80,75% der Isolate, wurde von den restlichen 20 klonalen Komplexen (inklusive none) gebildet. Meist clusterten die klonalen Komplexe eindeutig, wie z. B. CC5, ST573/772, CC25, CC121, CC15, CC7, CC12, CC 101, CC 78, ST152, CC1, CC6, CC59.

Sowohl ein ortsspezifisches Clustern, als auch ein Clustern gemäß dem Isolaturprung (nasal vs. klinisch) konnte nachgewiesen werden.

5.5 Hierarchische Clusteranalyse - länderspezifisch

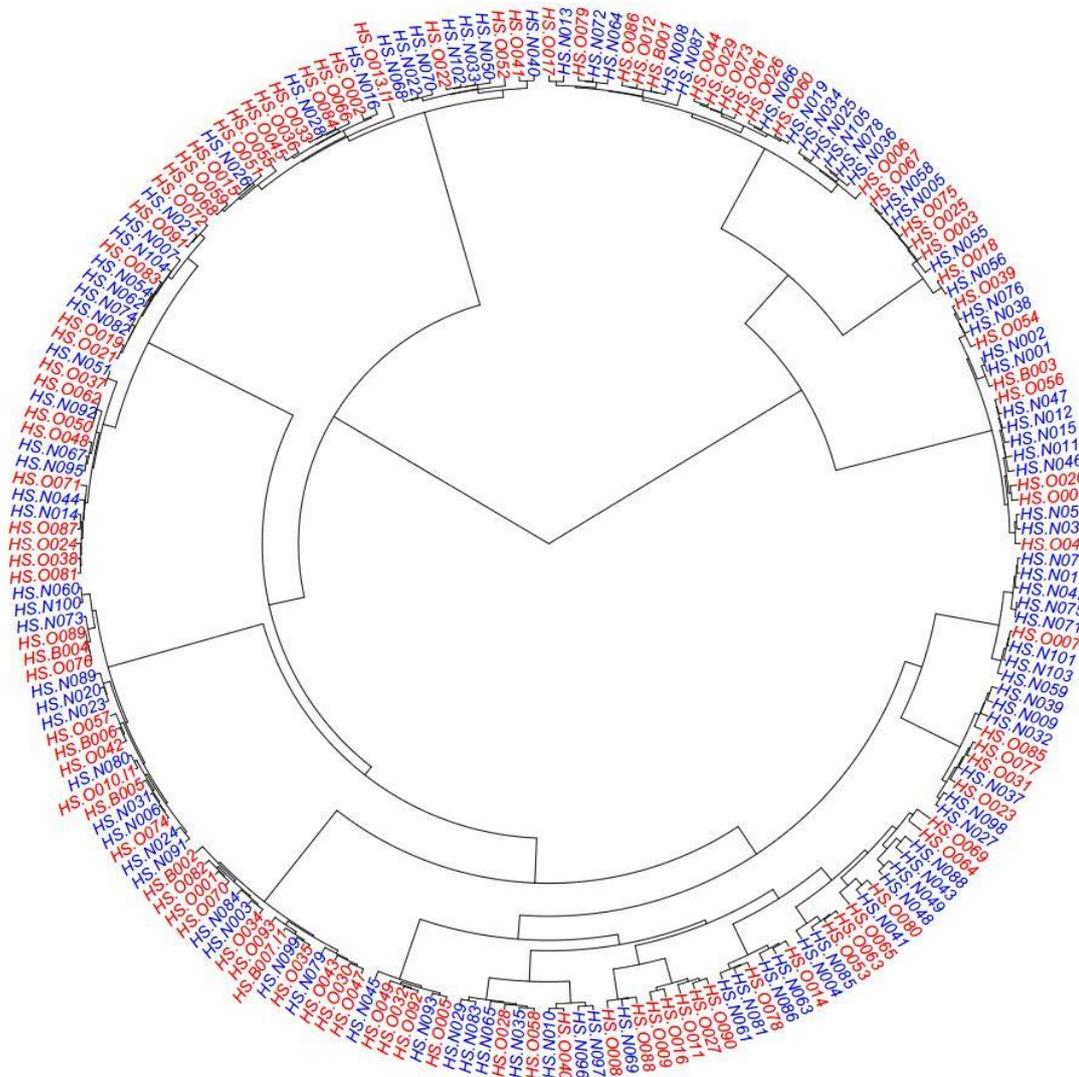


Abbildung 13: Analyse der Mikroarraydaten der *S. aureus* Isolate aus Homburg (200 Isolate) via hierarchischer agglomerativer Clusteranalyse. HS-N wurden blau, HS-O/B rot gekennzeichnet.

Die Verteilung der kommensalen und invasiven Isolate in Homburg war, wie in Abb. 13 dargestellt wurde, sehr ausgewogen. Je differenzierter man die Cluster betrachtete, desto deutlicher konnte ein Clustern nach Isolaturprung nachgewiesen werden.

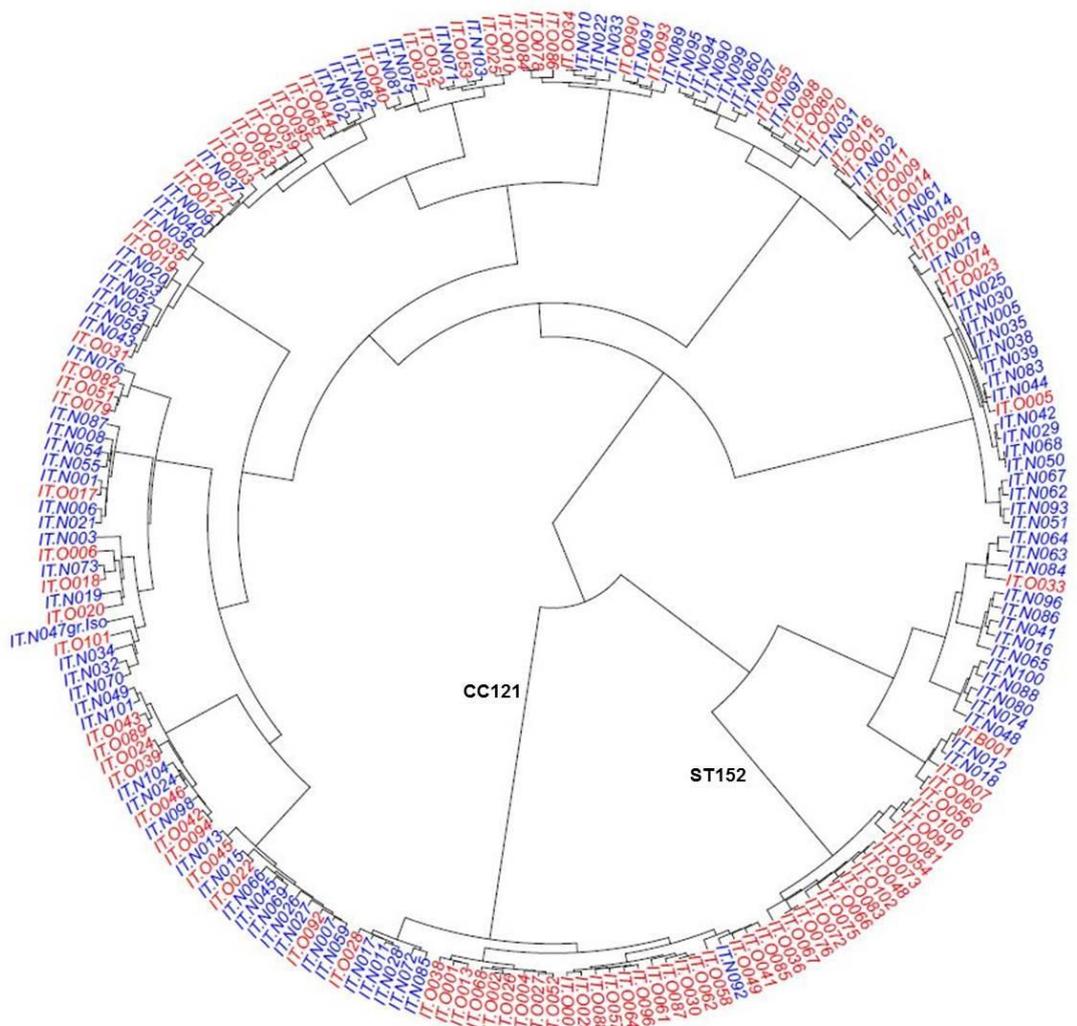


Abbildung 14: Analyse der Mikroarraydaten der *S. aureus* Isolate aus Ifakara (200 Isolate) via hierarchischer agglomerativer Clusteranalyse. IT-N wurden blau, IT-O/B rot gekennzeichnet.

Wie in Abb. 14 dargestellt wurde, clusterten die in Afrika gesammelten Isolate mehr nach ihren Isolatursprüngen zusammen. Man konnte ein eindeutiges Clustern der invasiven Isolate (CC121 und ST152), folglich auch der kommensalen, Isolate erkennen.

5.6 Spa-Typisierung Homburg

In den 200 aus Homburg untersuchten Isolaten konnten 115 verschiedene spa-Typen identifiziert werden, von denen drei als neue lokale spa-Typen noch mit einer neuen ID tx in die Datenbank des *RidomStaphType* aufgenommen wurden (Stand Januar 2013). Zusätzlich fanden wir zwei unbekannte spa-Typen, ein Isolat konnte nicht analysiert werden.

Mit 7% war t002 am häufigsten vertreten, gefolgt von t7568 mit 5%. Zu jeweils 4,5% vorhanden waren t084 und t091, zu 4% existent war t008. Der spa-Typ t003 existierte nur in 2% der Isolate.

Von den 20 in Homburg detektierten CC-Gruppen wurde die Verteilung der spa-Typen in den fünf häufigsten klonalen Komplexen CC7, CC5, CC45, CC15 und CC30 untersucht. In den nachfolgenden fünf Abbildungen wurde die Verteilung der einzelnen spa-Typen inklusive ihrer Häufigkeit im jeweiligen klonalen Komplex dargestellt.

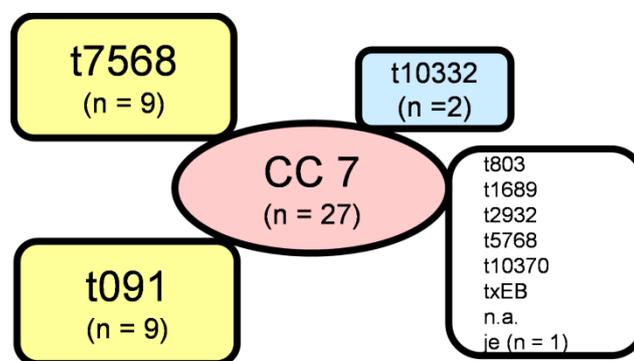


Abbildung 15: Die verschiedenen spa-Typen inkl. Anzahl (n) im CC7, farblich hervorgehoben nach Häufigkeit. n.a. steht für nicht analysierbar.

In der mit 27 Vertretern größten Gruppe CC7 dominierten t7568 und t091 mit jeweils 33,3%. Die restlichen acht verschiedenen spa-Typen fanden sich nur selten.

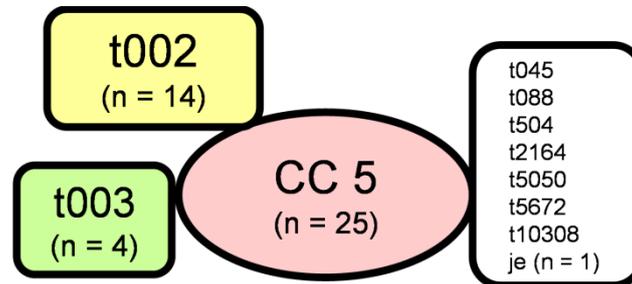


Abbildung 16: Die verschiedenen spa-Typen inkl. Anzahl (n) im CC5, farblich hervorgehoben nach Häufigkeit.

Der häufigste spa-Typ im klonalen Komplex CC5 war mit 56% t002, als zweithäufigster folgte mit nur 16% t003. Mit nur neun unterschiedlichen spa-Typen war der CC5 am wenigsten abwechslungsreich.

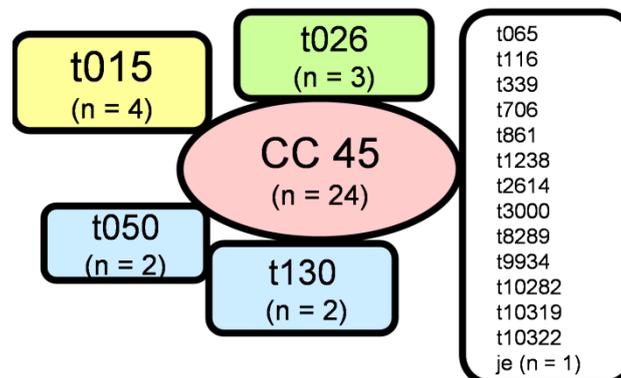


Abbildung 17: Die verschiedenen spa-Typen inkl. Anzahl (n) im CC45, farblich hervorgehoben nach Häufigkeit.

Der klonale Komplex CC45 war mit 17 verschiedenen spa-Typen der vielfältigste, mit nur vierfachem Vorkommen war t015 mit 16,7% der zahlreichste.

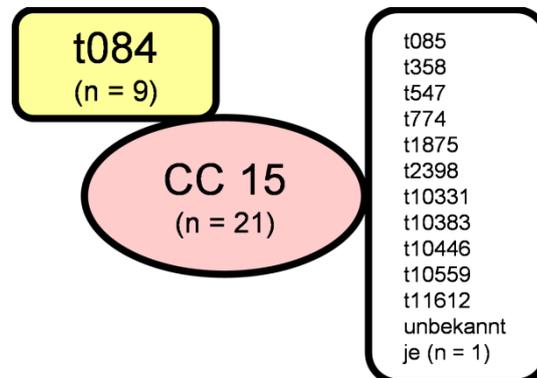


Abbildung 18: Die verschiedenen spa-Typen inkl. Anzahl (n) im CC15, farblich hervorgehoben nach Häufigkeit.

Mit etwa 43% überwiegt im CC15 der t084, die restlichen 12 spa-Typen fanden sich in jeweils nur einem Isolat.

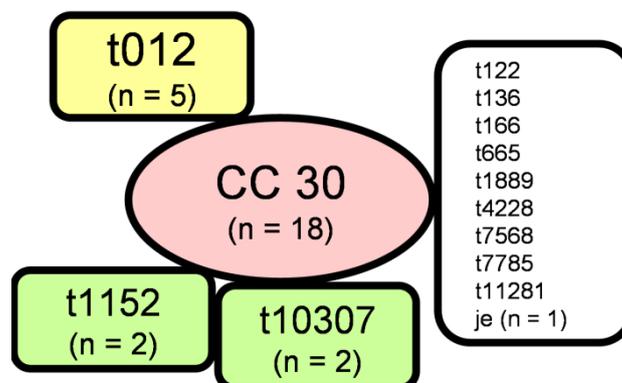


Abbildung 19: Die verschiedenen spa-Typen inkl. Anzahl (n) im CC30, farblich hervorgehoben nach Häufigkeit.

Etwas weniger als ein Drittel (27,8%) der spa-Typen im CC30 waren t012. Die restlichen elf verschiedenen spa-Typen fanden sich nur selten.

6 Diskussion

Staphylococcus aureus ist einer der bedeutendsten Krankheitserreger, sowohl in hochentwickelten Regionen als auch in Entwicklungsländern. In dieser Arbeit werden *S. aureus* Stämme, die ambulant erworbene Erkrankungen auslösen, aus Homburg und Ifakara untersucht. Ziel ist es nachzuweisen, dass sowohl zwischen den geografischen Regionen als auch zwischen kommensalen und invasiven Isolaten Unterschiede existieren. Mit Hilfe der DNA-Mikroarraytechnologie, als neuer, besonders gut standardisierter Typisierungsmethode, werden die Epidemiologie und die genetische Ausstattung der *S. aureus* Stämme untersucht. Nach unserem heutigen Wissensstand existiert keine vergleichbare Studie. Bisher durchgeführte Studien afrikanischer Isolate analysierten vorwiegend Einzelfaktoren oder kleinere Gruppen verschiedener klinisch relevanter Faktoren [Ateba Ngoa et al., 2012; Breurec et al., 2011; Schaumburg et al., 2011]. Insgesamt ist es auffällig, dass viele Studien zu Infektionen im Krankenhaus, nasalen Trägern und zu MRSA vorliegen [Moremi et al., 2012; Moyo et al., 2014; Shittu et al., 2009], jedoch keine Studie mit Kohorten nasaler Träger im Vergleich zu Stämmen, die invasive Infektionen auslösen.

Probanden/Patientencharakteristik

Die Rekrutierung spiegelt sowohl die natürliche Besiedelung gesunder Probanden wider als auch die Bedeutung ambulant erworbener *S. aureus* Infektionen. Im Unterschied zu vielen anderen Studien, die sich auf im Krankenhaus erworbene Infektionen beschränken, wird mit dieser Studie die natürliche Verbreitung in der Gesellschaft untersucht. Weitere epidemiologische Daten, wie Alter oder Geschlecht, die mit dem CRF-Bogen ermittelt wurden, werden in vorliegender Arbeit nicht berücksichtigt.

In dieser Studie lag die Prävalenz der kolonisierenden *S. aureus* Stämme in der gesunden Bevölkerung in Homburg/Saar bei 36,84%. Somit liegt die Kolonisationsrate etwas über dem in der Literatur beschriebenen Intervall von 25-30% [van Belkum et al., 2009; Wertheim et al., 2005]. Prävalenzdaten aus Ifakara liegen nicht vor.

Resistenzgene (*blaZ*, *mecA*, *tetK*, *ermA* und *ermC*)

Bezüglich der Resistenzgene konnte nachgewiesen werden, dass *S. aureus* Isolate aus Tansania deutlich häufiger mit Resistenzgenen ausgestattet waren als diejenigen aus Homburg.

Bei 78% wurde das *blaZ*-Gen detektiert. Die in der Literatur berichteten Penicillinresistenzen bestehen in mehr als 90% der Isolate sowohl bei kommensalen als auch invasiven Isolaten [Lowy, 2003]. Zusammen liegt die Prävalenz somit geringfügig unter den in der Literatur genannten Werten, ebenfalls ohne signifikante Unterschiede zwischen kommensalen (74,5%) und klinischen Stämmen (81,5%). Signifikante Unterschiede sind jedoch im regionalen Vergleich zwischen Homburg (61%) und Ifakara (95%) nachgewiesen worden. Die Rate der in Afrika gefundenen penicillinresistenten Stämme stimmt mit Studien aus Tansania (97%) [Blomberg et al., 2004], Südafrika (92%) [Shittu and Lin, 2006] und Gabun (95%) [Ateba Ngoa et al., 2012] überein.

In dieser Studie wurde mit 2% eine geringe Rate methicillinresistenter *S. aureus* gefunden. Im Vergleich zu den im Antibiotika Resistenz Surveillance System des RKI gesammelten Resistenzdaten (für stationäre Versorgung 21,1%, ambulante Versorgung 11,4%, [Robert-Koch-Institut, 2013]) lag die Prävalenz mit 1,5% in Deutschland deutlich unter den ermittelten Werten. In Tansania waren es 2,5% MRSA, entsprechend den bisherigen (afrikanischen) Studien aus Tansania mit <1% [Urassa et al., 1999], 2% [Blomberg et al., 2004] sowie aus Gabun mit 3% [Ateba Ngoa et al., 2012].

Im Mikroarray finden sich mehrere Genloci, die eine Makrolidresistenz vermitteln können. Dazu zählen *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *mefA* und *mpbBM*. Statistisch signifikante Unterschiede in der Prävalenz zeigten sich für *ermA* mit Häufung in saarländischen Isolaten (8,5% in Homburg vs. 0% in Ifakara) und *ermC* mit Häufung in tansanischen Isolaten (16,5% in Ifakara vs. 9% in Homburg). Die bisher berichteten Resistenzen gegen Makrolide lagen mit 29% in Tansania [Blomberg et al., 2004] und 30% in Südafrika [Shittu and Lin, 2006] eher über diesen Raten. Jedoch wurde zumindest in der Studie von Shittu and Lin ein Großteil der erythromycinresistenten Stämme von den MRSA gebildet. Betrachtete man dort nur die MSSA, waren diese zu 11,4% erythromycinresistent.

Hinsichtlich der Gene für eine Tetrazyklinresistenz wurden statistisch signifikante Unterschiede im regionalen Vergleich (28% in Tansania vs. 2% in Homburg), jedoch keine zwischen nasalen (11,5%) und invasiven Isolaten (18,5%) gefunden. Die Resistenzrate in Homburg ist in etwa vergleichbar mit den Raten der über das RKI vermittelten tetrazyklinresistenten *S. aureus* in Deutschland (stationär 3,9%, ambulant 4,6%, [Robert-Koch-Institut, 2013]). Die Rate in Tansania liegt deutlich unter den Werten einer in Tansania durchgeführten Studie (49%) [Blomberg et al., 2004].

Schon 2003 wurde von nicht proportional erhöhten Resistenzraten in Entwicklungsländern berichtet [Guven and Uzun, 2003]. Die höhere Rate an Resistenzgenen in Tansania kommt vermutlich durch die vorherrschenden lokalen Bedingungen zu Stande, wie sie schon 2004 verallgemeinernd über Entwicklungsländer beschrieben wurden: Überbevölkerung, Armut, Mängel der medizinischen Infrastruktur sowie die Gewohnheiten der Antibiotikaverschreibung [Raza et al., 2004]. Durch den uneingeschränkten Zugang zu einigen Antibiotika, die vor Ort im Handel als over the counter (OTC)-Präparate frei verfügbar sind, werden die Bakterien einem Selektionsdruck ausgesetzt.

Die geringe Rate an Resistenzgenen dieser Studie ist möglicherweise Folge der Einschlusskriterien. Im Unterschied zu früheren Studien wurden die Patienten dieser Studie gezielt mit nicht Krankenhaus-assoziierten Infektionen und die Probanden ohne vorherige Selektion, z. B. nach Alter, Geschlecht oder Risikofaktoren, ausgewählt. Vorsicht ist bei der Interpretation geboten, da die Ergebnisse nur eingeschränkt verglichen werden können. Grund hierfür ist die unterschiedliche Selektion der Probanden sowie die hier vorliegenden Daten „nur“ genotypischer Resistenzen. Unsere Ergebnisse reflektieren die genetische Ausstattung der *S. aureus* Stämme. Es ist nicht erkennbar, ob alle Resistenzfaktoren auch exprimiert werden und wenn dies der Fall wäre, welche Voraussetzungen dafür erfüllt werden müssten. In den meisten Studien wurden die Antibiotikaempfindlichkeiten phänotypisch über Agardiffusionstests ermittelt [Ateba Ngoa et al., 2012; Blomberg et al., 2004; Shittu and Lin, 2006]. Im DNA-Mikroarray werden Resistenzen z. B. gegen Makrolide über mindestens sechs verschiedenen Genloci ermittelt (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *mefA* und *mpbBM*), wohingegen phänotypisch einzelne Medikamente, meist Erythromycin für Makrolide, getestet werden. Der Vergleich der phänotypischen Resistenztestung mit der genotypischen Resistenztestung ist in einem unabhängigen Projekt des *african-german-staphnet* vorgesehen.

Virulenzgene (PVL, *lukD*, *lukE*, *egc*-Cluster, *etA*, *splA*, *splE*)

Das Gen für das Panton-Valentine-Leukozidin (*lukS/lukF*), als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren, war in den invasiven Isolaten (35%) fast siebenfach häufiger vertreten als in den nasalen Isolaten (5,5%). Diese Beobachtung stimmt mit der bisherigen Studienlage überein, im Hinblick auf das seltene Auftreten PVL-positiver Stämme in nasalen Isolaten [Melles et al., 2006; Prevost et al., 1995; von Eiff et al., 2004] und deren Neigung zu Haut- und Weichteilinfektionen [Holmes et al., 2005; Lina et al., 1999; Prevost et al., 1995]. Hier wurden nur 8 Blutstromisolate untersucht, nur eine (12,5%) enthielt PVL. Insgesamt 70 (35%) der klinischen Isolate waren PVL positiv. Aufgrund der geringen Menge an Blutstromisolaten (2%) ist die Vergleichbarkeit eingeschränkt. Dies scheint jedoch,

wie auch in den Studien zuvor schon berichtet, die bisherige Meinung zu bestätigen, dass PVL-positive Stämme eher mit Haut- und Weichteilinfektionen als mit Bakteriämien vergesellschaftet sind. Ein weiterer Unterschied bestand in der geografischen Verteilung mit eindeutiger Häufung in afrikanischen Isolaten (37,5% in Ifakara vs. 3% in Homburg). Das seltene Vorkommen PVL-positiver Stämme in europäischen Ländern wurde schon 2005 berichtet [Holmes et al., 2005]. Aktuell mangelt es an Daten zur Prävalenz von PVL in Tansania, einzige Daten zeigen eine Prävalenz von 16,7% in MRSA [Moremi et al., 2012]. Die nach unserem Wissensstand hier erstmals beschriebene hohe Prävalenz an PVL-positiven *S. aureus* Isolaten in Tansania stimmt mit anderen afrikanischen Studien aus Kamerun (74%), Madagaskar (33%), Marokko (17%), Niger (63%) und Senegal (67%) [Breurec et al., 2011] sowie aus Nigeria (42,7%) [Okon et al., 2009], Mali [Ruimy et al., 2008] und Gabun (44,7%) [Schaumburg et al., 2011] überein. Die elf nasalen Isolate, die PVL positiv waren, kamen ausschließlich aus Tansania. Jedoch ergab sich für Ifakara ebenfalls eine Häufung in klinischen Isolaten (64% klinisch vs. 11% nasal), wodurch die schon beschriebene Tendenz von PVL zu klinischen Isolaten [Schaumburg et al., 2011] bestätigt wird.

Bei den Genen der Leukozidine *lukD* und *lukE* gab es keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz sortiert nach Isolatur sprung (*lukD* 69,5% nasal vs. 65% klinisch, *lukE* 64,5% nasal vs. 67,5% klinisch). Von Eiff et al. fanden bei einer Studie eine Tendenz von *lukE/lukD* in invasiven Isolaten im Vergleich zu nasalen Isolaten, jedoch wurden damals *S. aureus* aus Bakteriämien als invasive Isolate gewertet [von Eiff et al., 2004]. Wundabstriche, wie sie in dieser Studie hauptsächlich getestet wurden, waren nicht miteingeschlossen. Leukozidine fanden sich jedoch signifikant häufiger in Tansania (*lukD* 73,5% in Ifakara vs. 61% in Homburg, *lukE* 77% in Ifakara vs. 55% in Homburg). Die von van Belkum beschriebene Tendenz des *egc*-clusters zu nasalen Isolaten [van Belkum et al., 2006] konnte hier nicht bestätigt werden. Das *egc*-cluster war in 44% der nasalen und in 46,5% der klinischen Isolate vertreten. Der geografische Unterschied war ebenfalls nicht signifikant.

Auffallend jedoch war das signifikant häufigere Vorkommen des Exfoliativtoxins *etA* in afrikanischen Isolaten (6,5% in Ifakara vs. 1,5% in Homburg) sowie in nasalen Isolaten (nasal 7,5% vs. 0,5%). Soweit uns zum aktuellen Zeitpunkt bekannt ist, wurde dies zum ersten Mal beschrieben. Ebenso scheinen die Gene der Serinproteasen *spIA* und *spIE* vermehrt in asymptomatischen Trägern vorzukommen (*spIA* nasal 71,5% vs. klinisch 60,5%, *spIE* 56% vs. 39%). Interessant ist die genetische Ausstattung mit Serinproteasen in den Ländern, im Vergleich zu den deutschen Isolaten haben die afrikanischen Isolate häufiger *spIA* und *spIB*, jedoch weniger *spIE*.

CC

Insgesamt wurden 24 verschiedene klonale Komplexe gefunden. Die fünf häufigsten CC waren CC5, CC15, CC121, CC8 und CC45.

In den nasalen Abstrichen in Homburg am häufigsten vertreten waren CC7, CC45, CC15, CC30 und CC5, wobei deutschlandweit regionale Unterschiede diskutiert wurden [Monecke et al., 2009]. In den invasiven Isolaten dominierten CC5, CC7, CC45, CC8 und CC15. In den deutschen Isolaten zeigten sich nur geringe Unterschiede in der Verteilung der klonalen Komplexe auf nasale oder klinische Isolate. Besonders auffällig war die signifikante Häufung von CC101 in nasalen Isolaten. Nach unserem Wissensstand ist dies erstmalig beschrieben.

In den nasalen Abstrichen in Ifakara am häufigsten vertreten waren CC15, CC8, CC5, CC45 und CC6. Diese Daten sind vergleichbar mit der Verteilung in Gabun und Mali, wo CC15 deutlich vorherrschend in asymptomatischen Trägern war [Ruimy et al., 2008; Schaumburg et al., 2011]. In den invasiven Isolaten dominierten CC121, ST152, CC78 und CC5. Diskrepanzen bestanden zu o.g. Studie aus Gabun, in der CC15 ebenfalls in den klinischen Isolaten dominierte [Schaumburg et al., 2011] sowie zu einer Studie aus Nigeria, in der CC5 dominierte [Ghebremedhin et al., 2009]. Die Dominanz von CC121 und ST152 in invasiven Isolaten wurde in Übereinstimmung mit vorherigen Studien

nachgewiesen [Breurec et al., 2011]. In den afrikanischen Isolaten zeigten sich größere Unterschiede in der Verteilung der klonalen Komplexe bzgl. nasaler oder klinischer Isolate. Besonders aufgefallen waren CC121 und ST152 mit signifikanter Häufung in invasiven Isolaten und die unterschiedliche Verteilung der Komplexe CC15, CC8 und CC45 mit signifikanter Häufung in nasalen Isolaten. In Homburg waren diese ausgeglichen verteilt, im Gegensatz zu Studien aus den Niederlanden [Melles et al., 2004]. Die in Tansania bestehende signifikante Häufung in nasalen Isolaten entspricht der Verteilung in Gabun [Schaumburg et al., 2011]. Diejenigen klonalen Komplexe, die einzig in Afrika vorkamen, mit Ausnahme von CC6, waren vermehrt invasive Isolate.

Der Großteil der bisherigen Studien stellt eher die Situation in West- bis Nordwestafrika (Gabun, Nigeria, Mali, Marokko) und in Südafrika dar [Breurec et al., 2011; Okon et al., 2009; Ruimy et al., 2008; Schaumburg et al., 2011; Shittu et al., 2009; Shittu et al., 2011]. Die Isolate aus Tansania zeigen die Situation im Osten Afrikas. Interessant wären Vergleiche der afrikanischen Länder untereinander.

Von besonderem Interesse ist die Prädominanz der PVL-positiven Stämme in den afrikanischen Isolaten sowie speziell in den hier typisch afrikanischen CCs (CC121, CC78, ST152, CC80). Diese Beobachtungen stützen die bisherigen Studien aus Nigeria [Shittu et al., 2011] und Mali [Ruimy et al., 2008]. Shittu et al. beschreiben ein vermehrtes Vorkommen PVL-positiver MSSA in den, in dieser Studie hauptsächlich in Afrika gefundenen, klonalen Komplexen CC1, CC121 und ST152 - sowie auch CC30 [Shittu et al., 2011]. Ruimy et al. beschreiben ebenfalls ein vermehrtes Vorkommen PVL-positiver Isolate in ST152 [Ruimy et al., 2008]. Interessant ist auch das seltene Vorkommen von PVL in den beiden häufigsten Komplexen CC5 und CC15.

Die Cluster der hierarchischen Clusteranalyse entsprechen bis auf wenige Ausnahmen den Zuordnungen in die klonalen Komplexe. Durch die Untersuchung der housekeeping Gene der MLST-Einteilung ist es nicht möglich, auf Virulenz mit

konsekutiver Invasivität zu schließen. Die Darstellung der gesamten Mikroarraydaten mittels der hierarchischen Clusteranalyse kombiniert hier die Verwandtschaftsanalyse (wie MLST) mit möglichen Gemeinsamkeiten in der genetischen Ausstattung der einzelnen Isolate. In den Clustern ist nochmals eine unterschiedliche Aufteilung der Isolate erkennbar, die auf der unterschiedlichen genetischen Ausstattung der Isolate beruht. Verdeutlicht wird dies mit der Darstellung in 5.3.2 der einzelnen klonalen Komplexe. So kann die Vielfältigkeit in den einzelnen Komplexen dargestellt werden.

Spa-Typisierung

Die spa-Typisierung ist eine weit verbreitete Typisierungsmethode von *S. aureus*, die zur Analyse von Ausbrüchen, jedoch nicht zur phylogenetischen Analyse verwendet wird. Die von uns ausschließlich mit den Homburger Isolaten durchgeführte Untersuchung zeigte eine hohe Diversität, 115 verschiedene spa-Typen konnten nachgewiesen werden. Dies bestätigt die schon beschriebene erhöhte Diversität der MSSA in den spa-Typen im Vergleich zur MRSA [Grundmann et al., 2010; Mehraj et al., 2014]. Die fünf häufigsten Vertreter unserer Studie waren t002 (7%), t7568 (5%), t084 (4,5%), t091 (4,5%) und t008 (4%). Laut *RidomSpaServer* sind die häufigsten spa-Typen t032 (10,4%), t003 (9,18%), t002 (6,69%) und t008 (6,28%) [RidomGmbH, 2014]. Jedoch sind in dieser Statistik alle spa-Typen ohne Vorauswahl aus 53 Ländern (Stand 19.12.2014) berücksichtigt, sodass MRSA sowie MSSA, sowohl aus der stationären als auch ambulanten Versorgung miteinbezogen werden. In der von Grundmann et al. durchgeführten europaweiten Studie war t002 ebenfalls mit 4,8% der häufigste Vertreter, bei Berücksichtigung nur deutscher Isolate waren jedoch t008, t084, t015 und t091 die häufigsten spa-Typen [Grundmann et al., 2010]. Mehrere spa-Typen clusterten in einem klonalen Komplex, wobei jeder spa-Typ einem bestimmten klonalen Komplex zugeordnet werden konnte - mit einer Ausnahme (t7568 einmalig in CC30, sonst in CC7). Die spa-Typisierung der afrikanischen Isolate sowie der Vergleich zwischen den beiden Regionen sind in einem weiteren unabhängigen Projekt des *african-german-staphnet* vorgesehen.

Diese Ergebnisse zeigen sowohl Unterschiede in der Verteilung der klonalen Komplexe als auch im Genrepertoire deutscher und afrikanischer *S. aureus* Stämme. Mithilfe der Kooperationspartner konnte eine Stammkollektion von 1200 *S. aureus* Isolaten, zur Hälfte von gesunden Trägern und zur Hälfte von ambulant erworbenen Infektionen gebildet, zusammengestellt werden. Eingeschlossen wurden dabei die Isolate dieser Arbeit sowie weitere Isolate aus Deutschland (Freiburg, Münster) und Afrika (Lambaréné/Gabun, Manhiça/Mosambique), die unabhängig untersucht wurden.

Eine umfassende genetische Charakterisierung wird zurzeit durchgeführt, um das Genrepertoire mit den klinischen und epidemiologischen Daten, erhoben via CRF, sowie mit den phänotypischen Resistenztestungen zu korrelieren. Für interessante Subgruppen werden weitere detaillierte Untersuchungen, wie z. B. die Ganzgenomsequenzierung oder SNP, folgen.

7 Anhang

7.1 Im Mikroarray Identibac® detektierte Gene mit Erklärung

	Explanation	Gene/Probe
Species Markers / Regulatory Genes	23S-rRNA Gene	23S-rRNA
	Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase	gapA
	Catalase	katA
	Coagulase	coA
	Staphylococcus Protein A	Protein A
	IgG-binding protein	sbi
	Thermostable Nuclease (DNAse)	nuc
	Fibronectin-binding Protein A	fnbA
	vaS Sensor Protein	vaS
	Staphylococcal Accessory Regulator A	sarA
	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase	eno
	Histidine Protein Kinase (sae Locus)	saeS
	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA	mecA
	Resistance Genotype	Beta-Laktamase
Beta Lactamase Repressor (Regulatory Protein)		blaI
Beta Lactamase Regulatory Protein		blaR
Macrolide, Lincosamide, Streptogramin		ermA
Macrolide, Lincosamide, Streptogramin		ermB
Macrolide, Lincosamide, Streptogramin		ermC
Lincosamides		linA
Macrolide		msrA
Macrolide		mefA
Macrolide		mpbBM
Streptogramine		vatA
Streptogramine		vatB
Streptogramine		vga
Streptogramine		vgaA
Streptogramine		vgb
Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)		aacA-aphD
Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)		aadD
Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)		aphA
Streptothricin		sat
Trimethoprim		dfrA
Fusidic acid		far
Putative Fusidic Acid Resistance Protein		Q6GD50
Mupirocin		mupR
Tetracycline		tetK
Tetracycline		tetM
Tetracyclin Efflux Protein (Putative Transport Protein)		tetEfflux
Chloramphenicol		cat
Chloramphenicol		fexA
Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones (Linezolid), Pleuromutilins, Streptogramin A		cfp
Putative Marker For Fosfomycin, Bleomycin		fosB
Vancomycin		vanA
Vancomycin		vanB
Vancomycin		vanZ
Mercury resistance operon		mercury resistance locus
Unspecific efflux pump		qacA
Unspecific efflux pump		qacC

	Explanation	Gene/Probe
Virulence Genotype	Toxic Shock Syndrome Toxin	tst-1
	Toxic Shock Syndrome Toxin, allele from bovine strains	tst-RF122
	Enterotoxin A	entA
	Enterotoxin A, allele from 320E	entA-320E
	Enterotoxin A, allele from N315	entA-N315
	Enterotoxin B	entB
	Enterotoxin C	entC
	Enterotoxin-like Protein (ORF CM14 of U10927.2)	entCM14
	Enterotoxin D	entD
	Enterotoxin E	entE
	Enterotoxin G	entG
	Enterotoxin H	entH
	Enterotoxin I	entI
	Enterotoxin J	entJ
	Enterotoxin K	entK
	Enterotoxin L	entL
	Enterotoxin M	entM
	Enterotoxin N	entN
	Enterotoxin N - other than RF122	entN_1
	Enterotoxin O	entO
	Enterotoxin Q	entQ
	Enterotoxin R	entR
	Enterotoxin U	entU
	Enterotoxins seg/sei/sem/sen/seo/seu	egg-cluster
	Pantone-Valentine Leukocidin	PVL
	Bovine Leukocidin	lukM/lukF-P83
	Haemolysin Gamma, Component B	lukF
	Haemolysin Gamma, Component C	lukS
	Haemolysin Gamma, Component C, allele from ST22 and ST45	lukS-ST22+ST45
	Haemolysin Gamma, Component A	hlqA
	Leukocidin D Component	lukD
	Leukocidin E Component	lukE
	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	lukX
	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	lukY-var1
	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein, allele from MRSA252	lukY-var2
	Hypothetical Protein similar to Haemolysin	hl
	Haemolysin Alpha (Alpha Toxin)	hla
	Haemolysin Delta (Amphiphilic Membrane Toxin)	hld
	Putative Haemolysin III	hlIII
	Putative Haemolysin III (other than RF122)	hl_III_Other than RF122
	Haemolysine Beta (Phospholipase C)	hib
	Haemolysine Beta (Phospholipase C / un-truncated)	un-truncated hib
	Staphylokinase	sak
	Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS)	chp(CHIPS)
	Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN)	scn
	Exfoliative Toxin A	etA
	Exfoliative Toxin B	etB
	Exfoliative Toxin D	etD
	Epidermal cell differentiation inhibitor A	edinA
	Epidermal cell differentiation inhibitor B	edinB
	Epidermal cell differentiation inhibitor C	edinC
	Aureolysin	aur
	Aureolysin, allele from other than MRSA252	aur - OtherThan252
	Aureolysin, allele from MRSA252	aur-MRSA252
	Serine Protease A	splA
	Serine Protease B	splB
	Serine Protease E	splE
	Glutamyl Endopeptidase / V8-Protease	sspA
	Staphopain B	sspB
	Staphopain A (Staphylopain A)	sspP
	Arginine catabolic mobile element	ACME-locus
	arginine deiminase	arcA-SCC
	ornithine transcarbamoylase	arcB-SCC
	carbamate kinase, locus 2	arcC-SCC
	arginine/ornithine antiporter	arcD-SCC
agr- Typing	Accessory Gene Regulator - Type 1	agrI
	Accessory Gene Regulator - Type 2	agrII
	Accessory Gene Regulator - Type 3	agrIII
	Accessory Gene Regulator - Type 4	agrIV
	SCCmec-Typing	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA
Signal Transducer Protein MecR1		mecR
Signal Transducer Protein MecR1 - truncated		mecR_truncated
Methicillin-Resistance Regulatory Protein		mecI
Glycerophosphoryl-diester-Phosphodiesterase (next to mecA)		ugpQ
Cassette Chromosome Recombinase A, type 1		ccrA-1
Cassette Chromosome Recombinase A, type 2		ccrA-2
Cassette Chromosome Recombinase A, type 3		ccrA-3
Cassette Chromosome Recombinase A, type ZH47		ccrAA-MRSAZH47
Cassette Chromosome Recombinase A, type 4		ccrA-4
Cassette Chromosome Recombinase B, type 1		ccrB-1
Cassette Chromosome Recombinase B, type 2		ccrB-2
Cassette Chromosome Recombinase B, type 3		ccrB-3
Cassette Chromosome Recombinase B, type 4		ccrB-4
Cassette Chromosome Recombinase C		ccrC
Mercuric Reductase (SCCmec type III)		merA
Alkylmercury Lyase (SCCmec type III)		merB
Potassium-transporting ATPase A chain		kdpA-SCC
Potassium-transporting ATPase B chain		kdpB-SCC
Potassium-transporting ATPase C chain		kdpC-SCC
Sensor Histidine Kinase (Sensor Protein located in kdp operon)		kdpD-SCC
KDP Operon Transcriptional Regulatory Protein (DNA-binding Response Regulator)		kdpE-SCC
plasmin-sensitive surface protein		plsSCC-COL
Hypothetical Protein Historical Name: CN050 Synonyms: dcs		Q9XB68-dcs
Pseudogene of Xylose Repressor		xyIR

	Explanation	Gene/Probe
Capsule / Biofilm	Capsule Type 1	capsule-1
	Capsule Type 5	capsule-5
	Capsule Type 8	capsule-8
	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 1	capH1
	O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 1	capJ1
	Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 1	capK1
	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 5	capH5
	O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 5	capJ5
	Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 5	capK5
	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 8	capH8
	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapI Capsule type 8	capI8
	O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 8	capJ8
	Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 8	capK8
	Intercellular Adhesion Protein A (N-glycosyltransferase)	icaA
	Intercellular Adhesion Protein C	icaC
	Biofilm PIA Synthesis Protein D	icaD
Surface Protein Involved In Biofilm Formation	bap	
MSCRAMMs / Adhesion Factors	Bone Sialoprotein-Binding Protein	bbp-all
	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from COL and MW2	bbp-COL+MW2
	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from MRSA252	bbp-MRSA252
	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from Mu50	bbp-Mu50
	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from RF122	bbp-RF122
	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from ST45	bbp-ST45
	Clumping Factor A	clfA-all
	Clumping Factor A, allele from RF122	clfA-COL+RF122
	Clumping Factor A, allele from MRSA252	clfA-MRSA252
	Clumping Factor A, allele from MU50 / MW2	clfA-Mu50/MW2
	Clumping Factor B	clfB-all
	Clumping Factor B, allele from COL / MU 50	clfB-COL+Mu50
	Clumping Factor B, allele from MW2	clfB-MW2
	Clumping Factor B, allele from RF122	clfB-RF122
	Collagen-Binding Adhesin	cna
	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein	ebh-all
	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase	eno
	Fibrinogen Binding Protein	fib
	Fibrinogen Binding Protein, allele from MRSA252	fib-MRSA252
	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein	ebpS
	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein, allele from ST45	ebpS-01-1111
	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein, allele from COL	ebpS-COL
	Fibronectin-Binding Protein A	fnbA-all
	Fibronectin-Binding Protein A, allele from COL	fnbA-COL
	Fibronectin-Binding Protein A, allele from MRSA252	fnbA-MRSA252
	Fibronectin-Binding Protein A, allele from MU50 / MW2	fnbA-Mu50+MW2
	Fibronectin-Binding Protein A, allele from RF122	fnbA-RF122
	Fibronectin-Binding Protein B	fnbB-COL
	Fibronectin-Binding Protein B, allele from COL / MU50 / MW2	fnbB-COL+Mu50+MW2
	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MU50	fnbB-Mu50
	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MW2	fnbB-MW2
	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST15	fnbB-ST15
	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST45	fnbB-ST45-2
	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein	map
	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, allele from RF122	map-RF122
	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, allele from MRSA252	map-MRSA252
	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, allele from MU50 / MW2	map-Mu50+MW2
	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C	sdrC-all
	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from B1	sdrC-B1
	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from COL	sdrC-COL
	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from MU50	sdrC-Mu50
	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from MW2 / MRSA252 / RF122	sdrC-MW2+MRSA252+RF122
	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from other than MRSA252 / RF122	sdrC-OtherThan252+122
	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D	sdrD-COL+MW2
	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from MU50	sdrD-Mu50
	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other	sdrD-other
	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other Than MRSA252 / RF122	sdrD-OtherThan252+122
	Willebrand Factor - Binding Protein	wfb-all
	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from COL / MW2	wfb-COL+MW2
	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from MRSA252	wfb-MRSA252
	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from MU50	wfb-Mu50
	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from RF122	wfb-RF122
	S. aureus Surface Protein G	sasG
	S. aureus Surface Protein G, allele from COL / MU50	sasG-COL+Mu50
	S. aureus Surface Protein G, allele from MW2	sasG-MW2
	S. aureus Surface Protein G, allele from other than MRSA252 and RF122	sasG-OtherThan252+122

	Explanation	Gene/Probe	
Immunevasion & Misc.	Immunodominant Antigen B	isaB	
	Immunodominant Antigen B, allele from MRSA252	isaB_MRSA252	
	Probable Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance)	mprF	
	Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance), allele from COL/MW2	mprF_COL+MW2	
	Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance), allele from MU50/MRSA252	mprF_Mu50+252	
	Heme/Transferrin-Binding Protein	isdA	
	Heme/Transferrin-Binding Protein, allele from MRSA252	isdA-MRSA252	
	Heme/Transferrin-Binding Protein, allele from OtherThanMRSA252	isdA-OtherThan252	
	Putative Transporter Protein	ImrP	
	Putative Transporter Protein, allele from RF122	ImrP-RF122	
	Multidrug Resistance Protein	Q2YUB3	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 1, allele from RF122	hsdS1-RF122	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from ST5 / ST8	hsdS2-ST5+ST8	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from MW2 / 476	hsdS2-MW2+476	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from FR122	hsdS2-RF122	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from MRSA252	hsdS2-MRSA252	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from any other than MRSA252 / RF122	hsdS3-AllOtherThanRF122+252	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from ST8 / ST1 / RF122	hsdS3-ST8+ST1+RF122	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from Mu50 / N315	hsdS3-Mu50+N315	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from CC51 / MRSA252	hsdS3-CC51+MRSA252	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from MRSA252	hsdS3-MRSA252	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type X, allele from CC25	hsdSx-CC25	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type X, allele from CC15	hsdSx-CC15	
	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type X, allele from etD	hsdSx-etd	
	Q2FXC0	Q2FXC0	
	Hypothetical Protein Next To entG	Q7A4X2	
	Hyaluronate Lyase A1_MRSA252	hysA1-MRSA252	
	Hyaluronate Lyase A1, alleles from MRSA252/RF122 and Hyaluronate Lyase A2, all alleles	hysA1-MRSA252+RF122 and hysA2-all	
	Hyaluronate Lyase A1, alleles from MRSA252/RF122 and Hyaluronate Lyase A2, all alleles	hysA1-MRSA252+RF122 and hysA2-COL+USA300	
	Hyaluronate Lyase A2, any other allele than MRSA252	hysA2-AllOtherThan252	
	Hyaluronate Lyase A2_COL/USA300/NCTC8325	hysA2-COL+USA300+NCTC	
	Hyaluronate Lyase A2, any other allele than COL/USA300/NCTC8325	hysA2-AllOtherThan COL+USA300+NCTC	
	Hyaluronate Lyase A2_MRSA252	hysA2-MRSA252	
	set / ssl Genes	Staphylococcal Superantigen-Like Protein C	setC_MW0345
		Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from COL / SCOL468	set6-COL-SACOL468
		Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from Mu50 / SAV0422	set6-Mu50-SAV0422
		Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from MW2 / MW0382	set6-MW2-MW0382
		Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from SAR0422-MRSA252	set6-SAR0422-MRSA252
		Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, any other allele	set6_All_Others
		Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1 - RF 122	set6_RF122
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 7 /SSL2		set7	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 8 /SSL3		set8/ssl3	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 8 /SSL3, allele from MRSA252-SAR0424		set8/ssl3-MRSA252-SAR0424	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 9 /SSL4		set9/ssl4	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 9 /SSL4, allele from MRSA252-SAR0425		set9/ssl4-MRSA252-SAR0425	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 3 /SSL5		set3/ssl5	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 3 /SSL5, allele from RF122		set3/ssl5-RF122	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 3 /SSL5, allele from MRSA252		set3/ssl5-MRSA252	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 21 /SSL6		set21/ssl6	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 21 /SSL6, allele from NCTC8325 / MW2		set21/ssl6-NCTC / MW2	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 /SSL7		set1/ssl7	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 /SSL7, allele from MRSA252		set1/ssl7-MRSA252	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 /SSL7, allele from AF188836		set1/ssl7-AF188836	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 12 /SSL8		set12/ssl8	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 5 /SSL9		set5/ssl9	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 5 /SSL9, allele from MRSA252		set5/ssl9-MRSA252	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 4 /SSL10		set4/ssl10	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 4 /SSL10, allele from RF122		set4/ssl10-RF122	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 4 /SSL10, allele from MRSA252		set4/ssl10-MRSA252	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from COL		set2/ssl11-COL	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from Mu50 / N315		set2/ssl11-Mu50/N315	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from MW2/MSSA476		set2/ssl11-MW2/MSSA476	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from MRSA252		set2/ssl11-MRSA252	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein B3		setB3	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein B3, allele from MRSA252		setB3-MRSA252	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein B2		setB2	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein B2, allele from MRSA252		setB2-MRSA252	
Staphylococcal Superantigen-Like Protein B1		setB1	

7.2 CRF HS-O

Infection Biology and Epidemiology of Staphylococci and Staphylococcal Diseases in Sub-Saharan Africa (DFG PAK296)

Case Report Form *S. aureus* nonbacteremic infection

Unique patient identifier

 - O

Study site - O (nonbacteremic infection) patient no. (e.g. 001)

IT = Ifakara-Bagamoyo/Tanzania, LG = Lambaréné/Gabon, MM = Manhiça/Moçambique,

FR = Freiburg i.Br., HS = Homburg-Saar, MW = Münster/Westfalen

General information

▪ Subject name (to be filled in the printed version):

▪ Date of birth (ddmmyyyy):

▪ Gender:

male female

▪ Date of study inclusion

(date of initial [culture-positive] sampling) (ddmmyyyy):

Inclusion criteria (all must be met)

- Written/signed informed consent: confirm
- *S. aureus* nonbacteremic infection: confirm
- Community-onset disease (positive samples taken ≤ 48 h of admission [including at transferring hospital]): confirm
- Patient is eligible: confirm

Investigator

Signature

Date

NOTE: After completion of this CRF, please send CRF saved under the unique patient identifier (see above to the left-hand side) to the data center via crf@uks.eu, print it, add information needed locally, sign it and store it at a safe place.

You will soon receive an excel file with data exported from this CRF for your cross-check and for uploading during preregistration of biomaterials from this case.

Name of responsible local study nurse/data manager:

Date CRF completed and sent (ddmmyyyy):

Infection Biology and Epidemiology of Staphylococci and Staphylococcal Diseases in Sub-Saharan Africa (DFG PAK296)

Case Report Form

S. aureus nonbacteremic infection

Demographic data

- Place of birth (country):
- Ethnicity:
- Place of residence
 - name of city or village/county (or region)
 - country
 - postal code (if available):
 - GPS coordinates:

(to be filled in the printed version if possible; for later reporting during biomaterials preregistration)

Patient history

- Previous hospitalization during the last 6 months prior to the present admission: yes no unknown
- Close health care contact (e.g. parenteral therapy, wound care, hemodialysis) within 30 days prior to SAB: yes no unknown
- Continuous residency in a nursing home before nonbacteremic infection: yes no unknown
- History of tuberculosis in the last 6 months: yes no unknown
- Antituberculous drugs within the last 4 weeks: yes no unknown
 - if, yes, was rifampicin including the regimen: yes no unknown
- Antibiotics within the last 4 weeks: yes no unknown

Clinical presentation

- Presentation with or development of severe sepsis 48 h following admission/presentation: yes no unknown
- Presentation with or development of septic shock 48 h following admission/presentation: yes no unknown
- Clinical site of infection:
 - superficial [skin & skin structure]
 - other (deep) sites to be specified:
 - bone
 - joint
 - deep skin abscess

Case Report Form
S. aureus nonbacteremic infection

- muscle: thigh
- muscle: regions other than thigh
- fasciitis
- respiratory tract/lungs incl. pleura
- heart/heart valve
- CSF/brain
- urinary tract
- other, please specify

Day 14 outcome variables

- Was the patient admitted to hospital care within 3 days after disease onset because of staphylococcal disease: yes no unknown
 if yes, date of discharge (dd.mm.yyyy) unknown
- Did the patient die within 14 days after disease onset: yes no unknown
 if yes, date of death (ddmmyyyy):
 specify (probable) cause of death:
- if not: last date known to be alive (ddmmyyyy)

Risk factors/comorbidities/underlying disease

- Intravenous drug abuse (IVDA): yes no unknown
- Intravascular catheter(s) present prior to disease onset: yes no unknown
- Other intravascular foreign bodies (i.e.artificial heart valves): yes no unknown
 - if yes, please specify
- Other foreign bodies (i.e. arthroplasty): yes no unknown
 - if yes, please specify

Infection Biology and Epidemiology of Staphylococci and Staphylococcal Diseases in Sub-Saharan Africa (DFG PAK296)

Case Report Form

S. aureus nonbacteremic infection

- HIV infection: yes no unknown
- Charlson comorbidity score items
 - Myocardial infarction/coronary heart disease yes no unknown
 - Congestive heart failure yes no unknown
 - Peripheral vascular disease yes no unknown
 - Cerebrovascular disease yes no unknown
 - Dementia yes no unknown
 - Chronic obstructive pulmonary disease yes no unknown
 - Connective tissue disease yes no unknown
 - Peptic ulcer disease yes no unknown
 - Mild liver disease yes no unknown
 - OR moderate-severe liver disease yes no unknown
 - Diabetes mellitus yes no unknown
 - OR diabetes mellitus with organ damage yes no unknown
 - Hemiplegia yes no unknown
 - Moderate-severe renal disease yes no unknown
 - Any tumour (within last 5 years) yes no unknown
 - Lymphoma yes no unknown
 - Leukemia yes no unknown
 - Metastatic solid tumor yes no unknown
 - AIDS yes no unknown
- McCabe-Jackson underlying disease prognosis score items
 - Does the patient have an underlying acute, fulminant disease expected to be rapidly (weeks/months) fatal yes no unknown
 - Does the patient have a chronic, incurable condition that is expected to be fatal within the next few years? yes no unknown
 - Does the patient have a chronic condition not expected to be fatal within the next 4 years? yes no unknown

Infection Biology and Epidemiology of Staphylococci and Staphylococcal Diseases in Sub-Saharan Africa (DFG PAK296)

Case Report Form

S. aureus nonbacteremic infection

Microbiology (initial isolate)

- Antibiogram
 - penicillin S R unknown
 - cefoxitin S R unknown
 - tetracycline S I R unknown
 - erythromycin S I R unknown
 - clindamycin S I R unknown
 - gentamicin S I R unknown
 - chloramphenicol S I R unknown
 - trimethoprim-sulfamethoxazole S I R unknown
- E-test results (MIC in µg/mL)
 - Cefoxitin .
 - Clindamycin .
 - Linezolid .
 - Vancomycin .
 - Daptomycin .
 - Tigecycline .
- Other tests
 - MRSA detection yes no unknown
if yes, describe method/result
 - Induced clindamycin resistance yes no unknown
- Were there multiple samples from identical site(s) positive for *S. aureus*: yes no unknown
- Were there multiple samples from different sites positive for *S. aureus*: yes no unknown
if yes, please specify the sites

NOTE: Please store and send up to three isolates (if available) per case including the initial isolate (mandatory) to the study center

Case Report Form
S. aureus nonbacteremic infection

Antibiotic treatment against staphylococci disease (day 0 = day of initial [culture-positive] sampling)

- Antibiotic(s) given on day 01:

name: application:
 daily dose: , g
 name: application:
 daily dose: , g

- Antibiotic(s) given on day 02:

name: application:
 daily dose: , g
 name: application:
 daily dose: , g

- Antibiotic(s) given on day 03:

name: application:
 daily dose: , g
 name: application:
 daily dose: , g

- Did the patient receive more than 3 full days of antibacterial therapy for staphylococcal disease? yes no unknown

Surgical treatment

- Incision/drainage within 3 days after disease onset: yes no unknown
- Removal of foreign body (if any) within 3 days after disease onset: yes no unknown/not applicable
- Other surgical procedures within 3 days after disease onset because of staphylococcal disease: yes no unknown
 if yes, type of surgery

and date of surgery (ddmmyyy)

Infection Biology and Epidemiology of Staphylococci and Staphylococcal Diseases in Sub-Saharan Africa (DFG PAK296)

Case Report Form *S. aureus* nonbacteremic infection

Sampling *S. aureus* isolates

Initial isolate

- Date of sampling (ddmmyyyy):
- Site of sampling:
- Local laboratory identifier/number *S. aureus* isolate:
- Unique *S. aureus* study isolate label: -O -11 Study site/subject no.

Second isolate

- Not done
- Date of sampling (ddmmyyyy):
- Site of sampling:
- Local laboratory identifier/number *S. aureus* isolate:
- Unique *S. aureus* study isolate label: -O -12 Study site/subject no.

Third isolate

- Not done
- Date of sampling (ddmmyyyy):
- Site of sampling:
- Local laboratory identifier/number *S. aureus* isolate:
- Unique *S. aureus* study isolate label: -O -13 Study site/subject no.

NOTE: Please send appropriately labelled materials as soon as possible to central storage facility. Note that you need to preregister at the StaphNet-Portal all specimens to be shipped; preregistration includes uploading the CRF data in an exported excel file as provided by the data center.

Name of responsible lab technician:

Do you confirm that the above data on sampling and labelling are correct:

Infection Biology and Epidemiology of Staphylococci and Staphylococcal Diseases in Sub-Saharan Africa (DFG PAK296)

Case Report Form

S. aureus nonbacteremic infection

Plasma/serum sampling

First serum / plasma

- Not done
- Date of serum / plasma sampling (ddmmyyyy):
- Local laboratory identifier/number serum/plasma sample:
- Unique serum label: -O **-S1** Study site/subject no.
- Unique plasma label: -O **-P1** Study site/subject no.

Second serum / plasma

- Not done
- Date of serum / plasma sampling (ddmmyyyy):
- Local laboratory identifier/number serum/plasma sample:
- Unique serum label: -O **-S2** Study site/subject no.
- Unique plasma label: -O **-P2** Study site/subject no.

Third serum / plasma

- Not done
- Date of sampling (ddmmyyyy):
- Local laboratory identifier/number serum/plasma sample:
- Unique serum label: -O **-S3** Study site/subject no.
- Unique plasma label: -O **-P3** Study site/subject no.

NOTE: Please send appropriately labelled materials as soon as possible to central storage facility. Note that you need to preregister at the StaphNet-Portal all specimens to be shipped; preregistration includes uploading the CRF data in an exported excel file as provided by the data center.

Name of responsible lab technician:

Do you confirm that the above data on sampling and labelling are correct:

8 Literaturverzeichnis

- Aires-de-Sousa M, Boye K, de Lencastre H, Deplano A, Enright MC, Etienne J, Friedrich A, Harmsen D, Holmes A, Huijsdens XW, Kearns AM, Mellmann A, Meugnier H, Rasheed JK, Spalburg E, Strommenger B, Struelens MJ, Tenover FC, Thomas J, Vogel U, Westh H, Xu J, Witte W. 2006. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *Journal of clinical microbiology* 44(2):619-621.
- Ako-Nai AK, Ogunniyi AD, Lamikanra A, Torimiro SE. 1991. The characterisation of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Ile-Ife, Nigeria. *Journal of medical microbiology* 34(2):109-112.
- Aly R, Levit S. 1987. Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. *Reviews of infectious diseases* 9 Suppl 4:S341-350.
- Anah MU, Udo JJ, Ochigbo SO, Abia-Bassey LN. 2008. Neonatal septicaemia in Calabar, Nigeria. *Tropical doctor* 38(2):126-128.
- Armstrong-Esther CA. 1976. Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. *Annals of Human Biology* 3(3):221-227.
- Ateba Ngoa U, Schaumburg F, Adegnika AA, Kusters K, Moller T, Fernandes JF, Alabi A, Issifou S, Becker K, Grobusch MP, Kremsner PG, Lell B. 2012. Epidemiology and population structure of *Staphylococcus aureus* in various population groups from a rural and semi urban area in Gabon, Central Africa. *Acta Tropica* 124(1):42-47.
- Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C. 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *Journal of clinical microbiology* 41(4):1434-1439.
- Berkley JA, Lowe BS, Mwangi I, Williams T, Bauni E, Mwarumba S, Ngetsa C, Slack MP, Njenga S, Hart CA, Maitland K, English M, Marsh K, Scott JA. 2005. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *The New England journal of medicine* 352(1):39-47.
- Blomberg B, Mwakagile DS, Urassa WK, Maselle SY, Mashurano M, Digranes A, Harthug S, Langeland N. 2004. Surveillance of antimicrobial resistance at a tertiary hospital in Tanzania. *BMC public health* 4:45.
- Bodmann K.-F. GBudEdP-E-GfCeV. 2010. Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen Update 2010. *Chemother J* 6:179–255.
- Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A. 2006. *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38(4):504-509.

- Breurec S, Fall C, Pouillot R, Boisier P, Brisse S, Diene-Sarr F, Djibo S, Etienne J, Fonkoua MC, Perrier-Gros-Claude JD, Ramarokoto CE, Randrianirina F, Thiberge JM, Zriouil SB, Working Group on Staphylococcus aureus I, Garin B, Laurent F. 2011. Epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages in five major African towns: high prevalence of Pantone-Valentine leukocidin genes. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17(4):633-639.
- Cavalcanti SM, Franca ER, Cabral C, Vilela MA, Montenegro F, Menezes D, Medeiros AC. 2005. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 9(1):56-63.
- Cole AM, Tahk S, Oren A, Yoshioka D, Kim YH, Park A, Ganz T. 2001. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8(6):1064-1069.
- Collignon PJ, Wilkinson IJ, Gilbert GL, Grayson ML, Whitby RM. 2006. Health care-associated *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a clinical quality indicator for all hospitals. *The Medical journal of Australia* 184(8):404-406.
- Cooper JE, Feil EJ. 2004. Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends in microbiology* 12(8):373-377.
- Cotton MF, Wasserman E, Smit J, Whitelaw A, Zar HJ. 2008. High incidence of antimicrobial resistant organisms including extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasopharyngeal and blood isolates of HIV-infected children from Cape Town, South Africa. *BMC infectious diseases* 8:40-2334-2338-2340.
- Crossley KB, Archer GL. 1997. *The staphylococci in human disease*, 1st edn. New York: Churchill Livingstone Inc.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews* 13(1):16-34, table of contents.
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* 15(2):167-193.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 38(3):1008-1015.
- Enright MC, Spratt BG. 1998. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 11)(Pt 11):3049-3060.

- Eriksen NH, Espersen F, Rosdahl VT, Jensen K. 1995. Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. *Epidemiology and infection* 115(1):51-60.
- Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NP. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology* 185(11):3307-3316.
- Feil EJ, Enright MC. 2004. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Current opinion in microbiology* 7(3):308-313.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science (New York, NY)* 269(5223):496-512.
- Foster TJ. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nature reviews Microbiology* 3(12):948-958.
- Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Microbiology* 12(1):49-62.
- Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandembroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR. 1996. 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 15(1):60-64.
- Frenay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandembroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen WJ, Mooi FR. 1994. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *Journal of clinical microbiology* 32(3):846-847.
- Ghebremedhin B, Olugbosi MO, Raji AM, Layer F, Bakare RA, Konig B, Konig W. 2009. Emergence of a community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with a unique resistance profile in Southwest Nigeria. *Journal of clinical microbiology* 47(9):2975-2980.
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piemont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359(9308):753-759.
- Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW, European Staphylococcal Reference Laboratory Working G. 2010. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS medicine* 7(1):e1000215.
- Guss B, Uhlen M, Nilsson B, Lindberg M, Sjoquist J, Sjudahl J. 1984. Region X,

- the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *European journal of biochemistry / FEBS* 138(2):413-420.
- Guven GS, Uzun O. 2003. Principles of good use of antibiotics in hospitals. *The Journal of hospital infection* 53(2):91-96; quiz 149.
- Hallin M, Denis O, Deplano A, De Ryck R, Crevecoeur S, Rottiers S, de Mendonca R, Struelens MJ. 2008. 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* 14(7):659-669.
- Hallin M, Deplano A, Denis O, De Mendonca R, De Ryck R, Struelens MJ. 2007. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of clinical microbiology* 45(1):127-133.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of clinical microbiology* 41(12):5442-5448.
- Herrmann M, Abdullah S, Alabi A, Alonso P, Friedrich AW, Fuhr G, Germann A, Kern WV, Kremsner PG, Mandomando I, Mellmann AC, Pluschke G, Rieg S, Ruffing U, Schaumburg F, Tanner M, Peters G, von Briesen H, von Eiff C, von Muller L, Grobusch MP. 2013. Staphylococcal disease in Africa: another neglected 'tropical' disease. *Future microbiology* 8(1):17-26.
- Herwaldt LA, Cullen JJ, French P, Hu J, Pfaller MA, Wenzel RP, Perl TM. 2004. Preoperative risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 25(6):481-484.
- Heysell SK, Sheno SV, Catterick K, Thomas TA, Friedland G. 2011. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among hospitalised patients with tuberculosis in rural Kwazulu-Natal. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 101(5):332-334.
- Hill PC, Onyema CO, Ikumapayi UN, Secka O, Ameyaw S, Simmonds N, Donkor SA, Howie SR, Tapgun M, Corrah T, Adegbola RA. 2007. Bacteraemia in patients admitted to an urban hospital in West Africa. *BMC infectious diseases* 7:2.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology* 9(10):486-493.
- Hoefnagels-Schuermans A, Peetermans WE, Jorissen M, Van Lierde S, van den Oord J, De Vos R, Van Eldere J. 1999. *Staphylococcus aureus* adherence to nasal epithelial cells in a physiological in vitro model. *In vitro cellular & developmental biology* 35(8):472-480.

- Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. 2005. Staphylococcus aureus isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *Journal of clinical microbiology* 43(5):2384-2390.
- Hooper DC. 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *The Lancet infectious diseases* 2(9):530-538.
- Jevons MP. 1961. "Celbenin"-resistant staphylococci. *British Medical Journal* 5219(1):124-125.
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews* 10(3):505-520.
- Kluytmans JA, Mouton JW, Ijzerman EP, Vandembroucke-Grauls CM, Maat AW, Wagenvoort JH, Verbrugh HA. 1995. Nasal carriage of Staphylococcus aureus as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery. *The Journal of infectious diseases* 171(1):216-219.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hiramatsu H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Lancet* 357(9264):1225-1240.
- Ladhani S. 2003. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. *FEMS immunology and medical microbiology* 39(2):181-189.
- Leclercq R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 34(4):482-492.
- Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Hook M, McCrea KW, McDevitt D, Brown EL. 2002. The Staphylococcus aureus Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *The Journal of clinical investigation* 110(10):1461-1471.
- Liakopoulos A, Foka A, Vourli S, Zerva L, Tsiapara F, Protonotariou E, Dailiana Z, Economou M, Papoutsidou E, Koutsia-Carouzou C, Anastassiou ED, Diza E, Zintzaras E, Spiliopoulou I, Petinaki E. 2011. Aminoglycoside-resistant staphylococci in Greece: prevalence and resistance mechanisms. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 30(5):701-705.
- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and

- pneumonia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 29(5):1128-1132.
- Loffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl BC, Proctor RA, Peters G. 2010. Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS pathogens* 6(1):e1000715.
- Lowy FD. 1998. Staphylococcus aureus infections. *The New England journal of medicine* 339(8):520-532.
- Lowy FD. 2003. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. *The Journal of clinical investigation* 111(9):1265-1273.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998. 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* 95(6):3140-3145.
- McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Review of Microbiology* 55:77-104.
- Mehraj J, Akmatov MK, Strompl J, Gatzemeier A, Layer F, Werner G, Pieper DH, Medina E, Witte W, Pessler F, Krause G. 2014. Methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus nasal carriage in a random sample of non-hospitalized adult population in northern Germany. *PLoS One* 9(9):e107937.
- Melles DC, Gorkink RF, Boelens HA, Snijders SV, Peeters JK, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, van Leeuwen WB, Simons G, Verbrugh HA, van Belkum A. 2004. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of Staphylococcus aureus. *J Clin Invest* 114(12):1732-1740.
- Melles DC, van Leeuwen WB, Boelens HA, Peeters JK, Verbrugh HA, van Belkum A. 2006. Pantón-Valentine leukocidin genes in Staphylococcus aureus. *Emerging infectious diseases* 12(7):1174-1175.
- Meremikwu MM, Nwachukwu CE, Asuquo AE, Okebe JU, Utsalo SJ. 2005. Bacterial isolates from blood cultures of children with suspected septicaemia in Calabar, Nigeria. *BMC infectious diseases* 5:110.
- Monecke S, Luedicke C, Slickers P, Ehricht R. 2009. Molecular epidemiology of Staphylococcus aureus in asymptomatic carriers. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 28(9):1159-1165.
- Monecke S, Slickers P, Ehricht R. 2008. Assignment of Staphylococcus aureus isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS immunology and medical microbiology* 53(2):237-251.
- Moremi N, Mshana SE, Kamugisha E, Kataraihya J, Tappe D, Vogel U, Lyamuya

- EF, Claus H. 2012. Predominance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* -ST88 and new ST1797 causing wound infection and abscesses. *J Infect Dev Ctries* 6(8):620-625.
- Moyo SJ, Aboud S, Blomberg B, Mkopi N, Kasubi M, Manji K, Lyamuya EF, Maselle SY, Langeland N. 2014. High nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy Tanzanian under-5 children. *Microbial drug resistance* 20(1):82-88.
- Mugalu J, Nakakeeto MK, Kiguli S, Kaddu-Mulindwa DH. 2006. Aetiology, risk factors and immediate outcome of bacteriologically confirmed neonatal septicaemia in Mulago hospital, Uganda. *African health sciences* 6(2):120-126.
- Novick RP. 1990. The staphylococcus as a molecular genetic system. In: Novick RP, editor. *Molecular biology of the staphylococci*. New York: VCH Publishers. p 1-37.
- Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular microbiology* 48(6):1429-1449.
- Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *The EMBO journal* 12(10):3967-3975.
- O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ. 2002. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cellular microbiology* 4(11):759-770.
- Ohlenschlager O, Ramachandran R, Guhrs KH, Schlott B, Brown LR. 1998. Nuclear magnetic resonance solution structure of the plasminogen-activator protein staphylokinase. *Biochemistry* 37(30):10635-10642.
- Ojukwu JU, Abonyi LE, Ugwu J, Orji IK. 2006. Neonatal septicemia in high risk babies in South-Eastern Nigeria. *Journal of perinatal medicine* 34(2):166-172.
- Ojulong J, Mwambu TP, Joloba M, Bwanga F, Kaddu-Mulindwa DH. 2009. Relative prevalence of methicilline resistant *Staphylococcus aureus* and its susceptibility pattern in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *Tanzania journal of health research* 11(3):149-153.
- Okon KO, Basset P, Uba A, Lin J, Oyawoye B, Shittu AO, Blanc DS. 2009. Cooccurrence of predominant Panton-Valentine leukocidin-positive sequence type (ST) 152 and multidrug-resistant ST 241 *Staphylococcus aureus* clones in Nigerian hospitals. *Journal of clinical microbiology* 47(9):3000-3003.
- Onipede AO, Onayade AA, Elusiyan JB, Obiajunwa PO, Ogundare EO, Olaniran OO, Adeyemi LA, Oyelami OO. 2009. Invasive bacteria isolates from children with severe infections in a Nigerian hospital. *Journal of infection in developing countries* 3(6):429-436.

- Owen RJ. 2004. Bacterial taxonomics: finding the wood through the phylogenetic trees. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 266:353-383.
- Parnaby RM, O'Dwyer G, Monsey HA, Shafi MS. 1996. Carriage of *Staphylococcus aureus* in the elderly. *The Journal of hospital infection* 33(3):201-206.
- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review of Microbiology* 48:585-617.
- Peacock SJ, Justice A, Griffiths D, de Silva GD, Kantzanou MN, Crook D, Sleeman K, Day NP. 2003. Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *Journal of clinical microbiology* 41(12):5718-5725.
- Prevost G, Couppie P, Prevost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, Monteil H, Piemont Y. 1995. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *Journal of medical microbiology* 42(4):237-245.
- Prevost G, Pottecher B, Dahlet M, Bientz M, Mantz JM, Piemont Y. 1991. Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *The Journal of hospital infection* 17(4):255-269.
- Que Y, Moreillon P. 2009. *Staphylococcus aureus* (including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone. p 2543-2578.
- Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, Vandenesch F, Tazir M, Etienne J. 2006. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(3):1083-1085.
- Rammelkamp CH, Maxon T. 1942. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Experimental Biology and Medicine* 51(3):386-389.
- Raza MW, Kazi BM, Mustafa M, Gould FK. 2004. Developing countries have their own characteristic problems with infection control. *The Journal of hospital infection* 57(4):294-299.
- Ridley M. 1959. Perineal carriage of *Staph. aureus*. *British medical journal* 1(5117):270-273.
- Ridom GmbH. 2014. Ridom SpaServer Datenstand 18.12.2014. www.spaserver.ridom.de.
- Robert-Koch-Institut. 2013. Antibiotika Resistenz Surveillance (ARS) Datenstand 25.09.2013.
- Roberts MC. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS*

- microbiology reviews 19(1):1-24.
- Roche FM, Meehan M, Foster TJ. 2003. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology (Reading, England)* 149(Pt 10):2759-2767.
- Rooijackers SH, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, Sim RB, van Wamel WJ, van Kessel KP, van Strijp JA. 2005. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nature immunology* 6(9):920-927.
- Ross JI, Eady EA, Cove JH, Baumberg S. 1995. Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene* 153(1):93-98.
- Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC. 1990. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Molecular microbiology* 4(7):1207-1214.
- Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TS, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, Hernandez-Roldan A, Brandao D, van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA. 2014. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med* 370(16):1524-1531.
- Ruimy R, Maiga A, Armand-Lefevre L, Maiga I, Diallo A, Koumare AK, Ouattara K, Soumare S, Gaillard K, Lucet JC, Andremont A, Feil EJ. 2008. The carriage population of *Staphylococcus aureus* from Mali is composed of a combination of pandemic clones and the divergent Panton-Valentine leukocidin-positive genotype ST152. *J Bacteriol* 190(11):3962-3968.
- Schaumburg F, Ngoa UA, Kosters K, Kock R, Adegnika AA, Kremsner PG, Lell B, Peters G, Mellmann A, Becker K. 2011. Virulence factors and genotypes of *Staphylococcus aureus* from infection and carriage in Gabon. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17(10):1507-1513.
- Schleifer KH, Bell JA. 2009. Family VIII. Staphylococcaceae fam. nov. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol 3 (The Firmicutes). Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer. p 392-421.
- Schmitz FJ, Fluit AC, Gondolf M, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J, Heinz HP, Jones ME. 1999. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 43(2):253-259.
- Shittu A, Nubel U, Udo E, Lin J, Gaogakwe S. 2009. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in KwaZulu-Natal

- province, Republic of South Africa. *J Med Microbiol* 58(Pt 9):1219-1226.
- Shittu AO, Lin J. 2006. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. *BMC infectious diseases* 6:125.
- Shittu AO, Okon K, Adesida S, Oyedara O, Witte W, Strommenger B, Layer F, Nubel U. 2011. Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Nigeria. *BMC microbiology* 11:92.
- Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of clinical microbiology* 37(11):3556-3563.
- Srinivasan A, Seifried S, Zhu L, Bitar W, Srivastava DK, Shenep JL, Bankowski MJ, Flynn PM, Hayden RT. 2009. Short communication: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children and young adults infected with HIV. *AIDS Research and Human Retroviruses* 25(12):1219-1224.
- Tuazon CU, Perez A, Kishaba T, Sheagren JN. 1975. *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients. An increased carrier rate. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 231(12):1272.
- Tuazon CU, Sheagren JN. 1974. Increased rate of carriage of *Staphylococcus aureus* among narcotic addicts. *The Journal of infectious diseases* 129(6):725-727.
- Uhlen M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M. 1984. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *The Journal of biological chemistry* 259(3):1695-1702.
- Urassa WK, Haule EA, Kagoma C, Langeland N. 1999. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains at Muhimbili Medical Centre, Tanzania. *East African medical journal* 76(12):693-695.
- van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, Wertheim HF, Verbrugh HA. 2009. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 9(1):32-47.
- van Belkum A, Melles DC, Snijders SV, van Leeuwen WB, Wertheim HF, Nouwen JL, Verbrugh HA, Etienne J. 2006. Clonal distribution and differential occurrence of the enterotoxin gene cluster, *egc*, in carriage- versus bacteremia-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 44(4):1555-1557.
- von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *The New England journal of medicine* 344(1):11-16.
- von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, Becker K. 2004. Prevalence of genes encoding

- for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 49(3):157-162.
- Weinke T, Schiller R, Fehrenbach FJ, Pohle HD. 1992. Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 11(11):985-989.
- Weinstein HJ. 1959. The relation between the nasal-staphylococcal-carrier state and the incidence of postoperative complications. *The New England journal of medicine* 260(26):1303-1308.
- Weisblum B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(3):577-585.
- Weller TM. 2000. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? *The Journal of hospital infection* 44(3):160-172.
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet infectious diseases* 5(12):751-762.
- Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, van Keulen PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meester MH, Verbrugh HA. 2004. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 364(9435):703-705.
- Williams RE. 1963. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriological Reviews* 27:56-71.
- Yu VL, Goetz A, Wagener M, Smith PB, Rihs JD, Hanchett J, Zuravleff JJ. 1986. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis. *The New England journal of medicine* 315(2):91-96.
- Zong Y, Xu Y, Liang X, Keene DR, Hook A, Gurusiddappa S, Hook M, Narayana SV. 2005. A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *EMBO J* 24(24):4224-4236.

9 Publikation

1. L. Wende, S. Schubert, U. Ruffing, M. Bischoff (Homburg), W. Kern, J. Hofmann (Freiburg), S. Abdulla (Dar es salaam/TZ), F. Schaumburg, G. Peters (Münster), A. Alabi, M. Grobusch (Lambaréné/Gabun), I. Mandomando (Maputo/MZ), A. Mellmann (Münster), A. Germann (St. Ingbert), M. Herrmann, L. von Müller (Homburg) (2012) *Characterisation of Staphylococcus aureus isolates of an African and German multicenter screening by DNA microarray-based genotyping*. Posterpräsentation, 64. Jahrestagung der DGHM, Hamburg. Abstract im International Journal of Medical Microbiology Volume 302, Supplement 1, page 87
2. U. Ruffing, L. Wende, S. Schubert (Homburg), T. Kazimoto, S. Abdulla (Tansania/TZ), R. Akulenko (Saarbrücken), A. Alabi (Gabon/GA), M. Bischoff (Homburg), A. Germann (Sulzbach), A. Friedrich (Münster), M.P. Grobusch (Gabon/GA), V. Helms (Saarbrücken), J. Hofmann, W.V. Kern (Freiburg), I. Mandomando (Maputo/MZ), A. Mellmann, G. Peters, F. Schaumburg (Münster), D. Vubil (Maputo/MZ), M. Herrmann, L. von Müller (2013) *African and German multicenter screening study of 1200 Staphylococcus aureus isolates*. Kongressbeitrag, 65. Jahrestagung der DGHM, Rostock. Abstract im International Journal of Medical Microbiology Volume 303, Supplement 1, page 77
3. U. Ruffing, L. Wende, S. Schubert, T. Kazimoto, S. Abdulla, R. Akulenko, A. Alabi, M. Bischoff, A. Germann, M. P. Grobusch, V. Helms, J. Hofmann, W. Kern, I. Mandomando, A. Mellmann, G. Peters, F. Schaumburg, D. Vubil, M. Herrmann, L. von Müller on behalf of the German-African study group of staphylococcus aureus (2013) *Characterisation of Staphylococcus aureus isolates of an African and German multicentre screening by DNA microarray-based genotyping*. 23. European Congress of Medical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) in Berlin. Abstract (publication only) in Molecular bacteriology.
4. U. Ruffing (Homburg), A. Abraham (Lambaréné/GA), S. Abdulla (Bagamoyo/TZ), R. Akulenko (Saarbrücken), H. von Briesen, A. Germann (Sulzbach), M. Grobusch (Amsterdam/NL), V. Helms (Saarbrücken), T. Kazimoto (Bagamoyo/TZ), W. Kern (Freiburg), I. Mandomando (Maputo/MZ), A. Mellmann (Münster), L. von Müller (Homburg), G. Peters, F. Schaumburg (Münster), Sa. Schubert (Homburg), D. Vubil (Maputo/MZ), L. Wende, M. Herrmann (Homburg) (2014) *Molecular genotyping of 1200 community*

- acquired commensal and clinical Staphylococcus aureus isolates of the African-German StaphNet multicenter study.* Kongressbeitrag, 66. Jahrestagung der DGHM/4. Gemeinsame Tagung von DGHM und VAAM, Dresden, Biospektrum, Tagungsband zur 4. Gemeinsamen Konferenz von DGHM und VAAM, Seite 121.
5. U. Ruffing (Homburg/Saar, Germany), R. Akulenko, L. Wende, S. Schubert, T. Kazimoto, D. Vubil, A. Alabi, M. Herrmann, F. Schaumburg, W. Kern (2014). *DNA microarray based genotyping of 1200 Staphylococcus aureus isolates of the African-German StaphNet multicentre study.* Posterpräsentation, 24. European Congress of Medical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) in Barcelona, S. 221.
 6. U. Ruffing (Univ. of Saarland Med. Faculty and Med. Ctr., Homburg/Saar, Germany), R. Akulenko (Univ. of Saarland, Homburg/Saar, Germany), L. Wende, S. Schubert (Univ. of Saarland Med. Faculty and Med. Ctr., Homburg/Saar, Germany), T. Kazimoto (Univ. of Saarland Med. Faculty and Med. Ctr., Homburg/Saar, Germany, Ifakara Hlth. Inst. (IHI), Bagamoyo, Tanzania, United Republic of), D. Vubil (Univ. of Saarland Med. Faculty and Med. Ctr., Homburg/Saar, Germany, Centro de Investigação em Saude da Manhica (CISM), Manhica, Mozambique), A. Alabi (Med. Res. Unit Albert Schweitzer Hosp. (ASHL), Lambarene, Gabon), F. Schaumburg (Univ. of Münster, Münster, Germany), W. Kern (Univ. of Freiburg Med. Ctr., Freiburg, Germany), M. Herrmann, L. von Mueller (Univ. of Saarland Med. Faculty and Med. Ctr., Homburg/Saar, Germany), StaphNet consortium (2014). *Molecular Epidemiology of Staphylococcus aureus Infections in Germany and Africa - a Multicenter Cohort Study using DNA Microarray to Characterize Invasive and Commensal Community-associated Isolates.* Posterpräsentation, ICCAC 2014 in Washington.

10 Danksagung

11 Lebenslauf