

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

**Etablierung einer Schnellnachweismethode für Methicillin-  
resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Protein A-  
gekoppelter immunomagnetischer Separation**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Kock, Astrid  
aus Lüdinghausen

2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt  
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. A.W. Friedrich  
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. D. Harmsen

Tag der mündlichen Prüfung: 22.08.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. A.W. Friedrich

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. D. Harmsen

## Zusammenfassung

„Etablierung einer Schnellnachweismethode für Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels Protein A-gekoppelter immunomagnetischer Separation“

Kock, Astrid

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) sind die häufigsten multiresistenten Erreger nosokomialer Infektionen. Ein möglichst schneller Nachweis bzw. Ausschluss einer MRSA-Besiedlung ermöglicht eine zeitnahe Umsetzung von Hygienemaßnahmen und die Verhinderung einer Übertragung.

In dieser Arbeit wurde ein schnelles Nachweissystem für MRSA, basierend auf einer immunomagnetischen Separation (IMS) zur spezifischen Anreicherung von *S. aureus* in Kombination mit einer MRSA-Selektivbouillon, neu etabliert. Anschließend wurde das Verfahren mit verschiedenen, u.a. mit MRSA versetzten Probenmaterialien evaluiert. Als MRSA-Bestätigungsreaktion wurde ein *mecA* und *nuc* Gennachweis durchgeführt. Parallel wurden alle Proben mittels konventioneller phänotypischer Verfahren untersucht.

Insgesamt wurden 95 Proben untersucht. Hierbei ergab sich eine Nachweisgrenze von  $10^2$  KBE/ml mit einer MRSA-Nachweisspezifität und -sensitivität von 100% mit daraus resultierenden positiven und negativen prädiktiven Werten (PPV/NPV) von jeweils 100%. Die Ergebnisse lagen nach maximal 36 h vor. Im Gegensatz dazu konnten mit dem konventionellen kulturellen Nachweisverfahren nur eine Sensitivität und Spezifität von 50% und 100% (100% PPV, 75,9% NPV) erreicht werden. Die durchschnittliche Dauer der Diagnostik betrug 52,8 h.

Durch den kombinierten Einsatz einer MRSA-Selektivbouillon mit einem *S. aureus*-spezifischen Anreicherungsverfahren konnte ein hochspezifisches, sensitives und ökonomisches Schnellnachweisverfahren von MRSA etabliert werden. Zukünftig können so mit Hilfe dieser Methode die Isolationsdauer von Patienten nach einer prophylaktischen Isolierung oder MRSA-Sanierungstherapie und die damit verbundenen Kosten reduziert werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.08.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1	Klinische Bedeutung von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
1.2	Bedeutung der zeitnahen MRSA-Diagnostik .....	8
1.3	Nachweisverfahren von MRSA .....	9
1.4	Alternative Nachweisverfahren von MRSA .....	10
1.5	Fragestellung.....	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1	Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien.....	13
2.1.1	Geräte .....	13
2.1.2	Chemikalien und sonstige Materialien.....	13
2.1.3	Materialien für den kulturellen Nachweis von MRSA.....	13
2.1.3.1	Nährmedien .....	13
2.1.3.2	Biochemische Reagenzien zur <i>S. aureus</i> Speziesdiagnostik...	14
2.1.3.3	Resistenztestung.....	14
2.1.4	Materialien für die immunomagnetische Separation .....	14
2.1.5	Materialien zum genotypischen Nachweis von MRSA .....	15
2.2	Methoden .....	15
2.2.1	Kultureller Nachweis und Resistenztestung von MRSA .....	16
2.2.2	Anreicherung des Abstrichmaterials mittels Selektivmedium ...	16
2.2.3	Durchführung der immunomagnetischen Separation .....	16
2.2.4	Durchführung der DNA-Extraktion.....	17
2.2.5	Durchführung des genotypischen Nachweises (PCR) von MRSA .....	18
2.2.7	Gelelektrophoretische Auftrennung und Färbung von DNA .....	19
2.3	Gesamtablauf des MRSA-Nachweises .....	20
2.4	Verwendete Referenzstämme und klinische Isolate .....	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
3.1	Etablierung der immunomagnetischen Separation.....	22
3.1.1	Sensitivitätstestung .....	22

3.1.2	Nachweis der spezifischen Anreicherung von <i>S. aureus</i> durch die IMS .....	23
3.1.3	Differenzierung zwischen <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> mittels IMS und PCR .....	25
<b>3.2</b>	<b>Testung der IMS mittels klinischer Isolate.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>Kombination von IMS und Anreicherungsbouillon .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>45</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>46</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>47</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Bedeutung von *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus*, dessen natürliches Habitat die Haut und Schleimhaut des Menschen und einiger Tiere ist, zählt zu den fakultativ pathogenen Krankheitserregern. Als insgesamt häufigster Erreger nosokomialer Infektionen wird *S. aureus* bei Wundinfektionen, Pneumonien, Sepsen, Endokarditiden und Katheter-assoziierten Infektionen nachgewiesen (28). Darüber hinaus besitzen einige *S. aureus* Isolate die Fähigkeit, über eine Toxinbildung gastrointestinale und andere Infektionen zu verursachen (2). In den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts traten die ersten *S. aureus* Isolate mit einer Resistenz gegen Methicillin (Methicillin-resistenter *S. aureus*, MRSA; synonym: Oxacillin-resistenter *S. aureus*, ORSA) auf. Diese Resistenz gilt nicht nur für diese speziellen Antibiotika, sondern ist gleichbedeutend mit einer Resistenz gegenüber sämtlichen  $\beta$ -Lactamantibiotika (Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme). Innerhalb kürzester Zeit hatten sich MRSA-Klone weltweit verbreitet, wo sie neben sporadischen Infektionen zunehmend Infektionsausbrüche auslösten. So stieg allein in Deutschland der MRSA-Anteil an allen *S. aureus* Infektionen von 1,7% (1990) auf 22,6% (2004) (<http://www.p-e-g.de>). Deutschland liegt damit im europäischen Mittelfeld (<http://www.earss.rivm.nl>), in den USA gibt es regional stark schwankende MRSA-Raten bis über 50% (39). Betrachtet man jedoch in den einzelnen Ländern die Zunahme an MRSA, so ist Deutschland in Europa das Land mit der höchsten Zuwachsrate an MRSA (43). Die Methicillinresistenz ist aufgrund von Therapieschwierigkeiten (es wirken nur noch Reserveantibiotika wie Glykopeptide, Oxazolidinone und Glycylcycline) und den damit verbundenen Kosten von hoher Relevanz. Auch konnte gezeigt werden, dass systemische MRSA-Infektionen im Vergleich zu Infektionen mit Methicillin-sensiblen *S. aureus* eine erhöhte Mortalität aufweisen (8). Im Jahr 2002 wurde zudem der erste Vancomycin-resistente MRSA (VRSA) nachgewiesen (5). Eine weitaus größere Bedrohung geht allerdings von den „community-acquired“ MRSA

(cMRSA, syn. CA-MRSA) aus. Diese Erreger sind aus Methicillin-sensiblen *S. aureus* Stämmen (MSSA) entstanden, die aufgrund ihrer Ausstattung mit dem Virulenzfaktor Panton-Valentine-Leukozidin (PVL) schwerste Infektionen verursachen können. Erst kürzlich haben diese die für die Methicillinresistenz kodierende Genkassette erworben (38) und bereits eine Vielzahl von schwersten Infektionen verursacht (16, 34).

## **1.2 Bedeutung der zeitnahen MRSA-Diagnostik**

Der möglichst schnelle und valide Nachweis von MRSA aus klinischen Materialien und Surveillance-Kulturen ist entscheidend für die nachfolgenden therapeutischen und hygienischen Entscheidungen. So bedeutet der Nachweis von MRSA aus einem klinischen Material, z.B. einer Blutkultur, häufig den Einsatz von Reserveantibiotika (z.B. Glykopeptide, Oxazolidinone), um die Infektion wirksam behandeln zu können (45). Um die Verbreitung von MRSA im Krankenhaus zu verhindern, wo er häufig auf immungeschwächte Patienten und damit besonders suszeptible Organismen treffen und entsprechend schwere Infektionen verursachen kann, werden Patienten, die diesen Keim in sich tragen, meist nur unter aufwändigen Hygienemaßnahmen behandelt. Dies bedeutet in der Regel eine Einzelunterbringung sowie Pflege, diagnostische und therapeutische Eingriffe nur unter entsprechenden Schutzmaßnahmen (Kittel, Handschuhe, Mundschutz, erweiterte Desinfektionsmaßnahmen v.a. der patientennahen Oberflächen), um den Hauptübertragungsweg, die direkte und indirekte Übertragung durch Schmierinfektion zu unterbinden. Resultieren aus einem einzelnen MRSA-Nachweis aus Surveillance-Kulturen im Rahmen von routinemäßigem Screening oder gezielten Umgebungsuntersuchungen bei Ausbruchsverdacht im Krankenhaus bereits aufwändige Hygienemaßnahmen, können gehäufte Nachweise die Schließung ganzer Stationen nach sich ziehen (29). Zudem ist eine Häufung nosokomialer Infektionen gemäß dem Infektionsschutzgesetz §6 meldepflichtig. Aus diesen Gründen zählt jeder Tag, der beim MRSA-Nachweis bzw. Ausschluss eingespart wird, da eine gezielte antibiotische Therapie frühzeitiger begonnen, bzw. eine bereits bestehende



Isolierung des Patienten nach MRSA-Ausschlussdiagnostik beendet werden kann.

### 1.3 Nachweisverfahren von MRSA

Der kulturelle Nachweis von *S. aureus* und die anschließende phänotypische Resistenztestung gegen Oxacillin / Methicillin ist ein Standardverfahren in jedem mikrobiologischen Labor. Diese Verfahren dauern in der Regel drei bis fünf Tage – abhängig davon, in welchem Ausmaß noch Isolierungen einzelner verdächtiger Kulturen aus einer Mischkultur angelegt werden müssen. Erst mit einer Reinkultur von *S. aureus* ist eine Resistenztestung und damit die Diagnose MRSA möglich. Mittels kommerziell erhältlicher Agglutinationstests (z.B. PBP-2a-Nachweis der Fa. Innogenetics) lässt sich das modifizierte Penicillin-Bindungsprotein PBP-2a, das für die Resistenz verantwortlich ist (40), innerhalb weniger Minuten durch eine Agglutinationsreaktion mit Anti-PBP-2a nachweisen – allerdings bestehen mögliche Kreuzreaktionen mit anderen ebenfalls Methicillin-resistenten Staphylokokkenspezies wie *S. epidermidis* (4, 22, 49).

Der Goldstandard für den Nachweis der Methicillinresistenz ist der genotypische Nachweis des *mecA* Resistenzgens, z.B. mittels PCR (32). Jedoch gibt es, vergleichbar mit den Kreuzreaktionen der PBP-2a-Nachweise, aufgrund der DNA-Sequenzhomologien der *mecA* Gene anderer Methicillin-resistenter Staphylokokkenspezies auch falsch positive Ergebnisse. Aus diesem Grund kann bei Direktnachweisen aus Mischkulturen oder aus primär nicht sterilen Materialien, wie z.B. einem Nasenabstrichtupfer, das *mecA* Gen nicht als einziger genetischer Marker für einen MRSA genommen werden. Viele genotypische Nachweisverfahren kombinieren deshalb den *mecA* Nachweis mit einem für *S. aureus* spezifischen Gennachweis, z.B. dem *nuc* (kodierend für eine *S. aureus* spezifische Nuklease) Gen. Kürzlich wurde ein neuer Ansatz entwickelt, in nur einer Reaktion MRSA nachzuweisen. Hierbei wurde der für *S. aureus* spezifische Übergangsbereich zwischen dem Methicillin-Resistenzgen und dem *S. aureus* Chromosom detektiert, um falsch

positive Reaktionen bei Methicillin-resistenten *S. epidermidis* (MRSE) und anderen Methicillin-resistenten Staphylokokkenspezies auszuschließen (9). Diese Tests sind inzwischen evaluiert und in verschiedenen kommerziellen Kits umgesetzt worden (11). So ist es seit kurzem mit den neuen „real-time“-PCR-Technologien grundsätzlich möglich, innerhalb von wenigen Stunden einen MRSA sogar aus einer Mischkultur oder direkt aus einem primär nicht sterilen Material, wie z.B. einem Nasenabstrichtupfer, nachzuweisen. Nachteil dieser Verfahren sind neben den hohen Investitionskosten für diese Technologie die noch sehr hohen Verbrauchskosten. Außerdem liegt am Ende des Befundes kein Stammisolat vor, das zur Feintypisierung für epidemiologische Untersuchungen näher charakterisiert werden kann, sodass eine Kultivierung im Anschluss auf jeden Fall erforderlich ist. Außerdem ist noch unklar, inwieweit der Nachweis von MRSA-DNA gleichbedeutend mit einer MRSA-Besiedlung ist, sofern sich im Anschluss an einen positiven Schnelltestbefund kein Isolat anzüchten lässt.

#### **1.4 Alternative Nachweisverfahren von MRSA**

Um die MRSA-Nachweissensitivität und –spezifität zu erhöhen und sicher einen Direktnachweis aus klinischem Material zu ermöglichen, ohne die noch sehr teuren „real-time“-PCR-Verfahren zu verwenden (Kosten ca. 40-70 €), ist eine spezifische Anreicherung von MRSA im Untersuchungsgang erforderlich. Möglich ist die Verwendung von Selektivmedien (Kosten ca. 4-10 €), die aber eine Kultivierung zumindest von einigen Stunden erfordern (25). Eine weitere Alternative ist der Einsatz der immunomagnetischen Separation (IMS). Bei diesem Verfahren werden zunächst Erreger-spezifische Antigene an entsprechende Antikörper-beschichtete magnetische Partikel gebunden. Im zweiten Schritt werden diese Komplexe dann aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften vom restlichen Material getrennt, und es wird so eine spezifische Anreicherung erzielt (Kosten ca. 10-20 €). Dieses Verfahren wird bereits seit Jahren in der Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) erfolgreich eingesetzt, um aus Stuhlanreicherungskulturen

spezifisch die Erreger der Serogruppe O157 nachzuweisen (23). Kürzlich wurde dieses Verfahren für den Nachweis von MRSA adaptiert. Hierbei wurde als Antigen das *S. aureus* Protein A (Spa) ausgewählt und Anti-Protein A beschichtete magnetische Partikel eingesetzt. Mit dem separierten Material wurde dann zur Bestätigung eine Multiplex-PCR durchgeführt und die einzelnen Gene wurden mittels fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonden detektiert (14). Die Ergebnisse dieser Studie ergaben einen schnellen Nachweis von MRSA (innerhalb von 6 Stunden). Die im Vergleich zum kulturellen Nachweis höhere Anzahl von MRSA-Nachweisen konnte in allen Fällen mit der höheren Nachweissensitivität erklärt werden. Zum einen gab es bei allen Schnelltest-positiven Patienten dieser Studie eine positive MRSA-Anamnese, zum anderen konnte in erneuten Abstrichen innerhalb von zwei Wochen die MRSA-Besiedlung auch kulturell bestätigt werden (14). Nachteilig an diesem Verfahren ist auch hier wieder die fehlende Kultur zur weiteren Charakterisierung der Isolate.

## **1.5 Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit war es, durch eine Kombination aus einem Selektivmedium für die Anzucht von MRSA mit der *S. aureus*-spezifischen IMS als einem nicht-molekularen Anreicherungsverfahren die Nachweisdauer von MRSA aus Surveillance-Kulturen zu verkürzen. Hierbei sollte zunächst die IMS für *S. aureus* etabliert und ihre Spezifität evaluiert werden, indem u.a. verschiedene Kombinationen von Methicillin-resistenten und –sensiblen Staphylokokken eingesetzt wurden. Im Weiteren wurden Surveillance-Kulturen von Intensivstationen untersucht, um das Verfahren mit den herkömmlichen zu vergleichen. Als Kontrolle und Bestätigungsverfahren wurden dazu parallel kulturelle Anzüchtungen und molekularbiologische Nachweisverfahren durchgeführt. Ziel ist es, mittels einer Schnelldiagnostik die Dauer der prophylaktischen Isolationsmaßnahmen von Patienten (z.B. für Patienten, die aus anderen Krankenhäusern mit einer hohen MRSA-Prävalenz verlegt werden) zu verkürzen und bei MRSA-Patienten in Isolation diese nach einer

Sanierungstherapie schneller aufheben zu können. Schließlich könnten die zusätzlichen Kosten aufgrund von MRSA-Patienten deutlich reduziert werden, da die verkürzt anfallenden Kosten aufgrund von Bettensperrungen und erweiterten Hygienemaßnahmen die initial höheren Kosten für den MRSA-Nachweis bzw. –Ausschluss bei weitem überwiegen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien**

#### 2.1.1 Geräte

Soweit nicht speziell bei den einzelnen Methoden vermerkt, wurden Pipetten, Zentrifugen, Brutschränke, Inkubatoren, Mixer, Thermocycler, Elektrophorese-Einrichtungen und eine Photodokumentationsanlage der Firmen Biometra (Göttingen), Eppendorf GmbH (Hamburg), Heraeus GmbH (Hanau), BioRad GmbH (München) sowie vergleichbare Geräte einer Standardlaboreinrichtung verwendet.

#### 2.1.2 Chemikalien und sonstige Materialien

Alle Chemikalien, Plastik- und Glaswaren wurden, soweit nicht abweichend vermerkt, von den Firmen Eppendorf, ABGene (Hamburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma und Sigma-Genosys (Darmstadt) bezogen.

Spezielle Chemikalien und Reagenzien sind, insbesondere für die molekularbiologischen Verfahren, bei den jeweiligen Methoden gesondert aufgeführt.

#### 2.1.3 Materialien für den kulturellen Nachweis von MRSA

##### 2.1.3.1 Nährmedien

Für die Anzüchtung, Kultivierung und Resistenztestung der verwendeten Referenzstämme und der Isolate aus Surveillance-Kulturen wurden Columbia-Blut- und Müller-Hinton-Agar der Firma Heipha (Heidelberg) sowie als Anreicherungsmedium eine Dextrosebouillon (Herstellung aus der Nährbodenküche des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Münster, Münster) verwendet.

#### 2.1.3.2 Biochemische Reagenzien zur *S. aureus* Speziesdiagnostik

Zur biochemischen Bestimmung der Spezies wurden die folgenden Tests durchgeführt: (i) Färbung nach Gram (3), Reagenzien (Eigenherstellung aus der Nährbodenküche Institut für Medizinische Mikrobiologie), (ii) Katalase-Reaktion mit Katalasereagenz (3%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Eigenherstellung Apotheke, Universitätsklinikum Münster), (iii) Nachweis von gebundener und freier Koagulase mittels Latexagglutination (Genozyme Virotech, Rüsselsheim) und Kaninchencitratplasma (BioMérieux, 69280 Marcy l'Etoile, Frankreich) und (iv) Api ID 32 Staph (BioMérieux). Das Api ID 32 Staph ist ein System zur biochemischen Identifizierung von Staphylokokken. Der standardisierte Test umfasst 32 biochemische Reaktionen, anhand derer die Speziesenteilung vorgenommen wird. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.1.3.3 Resistenztestung

Für die phänotypische Resistenztestung wurden E-Test-Streifen (AB BIODISK, Solna, Schweden) verwendet. Dieser Test beruht auf dem Prinzip der Agardiffusion. Die Teststreifen mit exponentiell zunehmender Antibiotikakonzentration werden auf einen mit einer McFarland-Standard 0,5 einer *S. aureus* Reinkultur beimpften Müller-Hinton-Nährboden gelegt und entsprechend den Herstellerangaben abgelesen. Eine minimale Hemmkonzentration (MHK) von  $\geq 4$  wurde als resistent bewertet (nach NCCLS, Etest-Application Sheet EAS003 for Staphylococci, NCCLS, AB-Biodisk 2000, M0000143-M1800). Die MHK entspricht der niedrigsten Konzentration eines Antibiotikums, bei der kein Wachstum zu erkennen ist.

#### 2.1.4 Materialien für die immunomagnetische Separation

Für die immunomagnetische Separation (IMS) wurden Anti-*Staphylococcus aureus* Protein A (Sigma) beschichtete magnetische Beads (Dynal, Hamburg) verwendet.

### 2.1.5 Materialien zum genotypischen Nachweis von MRSA

Für den genotypischen Nachweis des *mecA* (kodiert für die Methicillinresistenz) und des *nuc* Gens (kodiert für eine *S. aureus*-spezifische Nuklease) wurden die in Tabelle 2.1 aufgezählten Oligonukleotide (Sigma-Genosys) verwendet.

Oligo-nukleotid	Sequenz (5'-3'-Richtung)	Annealing-Temperatur	Zielgen	Größe des Amplifikats
MEC 5	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	59°C	<i>mecA</i>	533 bp
MEC 6	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C			
NUC 1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	59°C	<i>nuc</i>	279 bp
NUC 2	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC			

Tabelle 2.1 Oligonukleotide zum Nachweis des *mecA* und des *nuc* Gens von *S. aureus*.

Die dNTPs wurden von der Firma Eppendorf, die Taq-Polymerase AmpliTaq Red, MgCl<sub>2</sub> und Polymerasepuffer von Applied Biosystems (Darmstadt) bezogen.

## 2.2 Methoden

Um unter möglichst realistischen Bedingungen die Tests zur Etablierung und Evaluierung der IMS durchzuführen, wurde von einer Keimkonzentration von 10<sup>3</sup> Bakterien pro ml bzw. pro Abstrichtupfer ausgegangen. Diese Konzentration entspricht in etwa der minimalen der Anzahl von Bakterien, die mit einem herkömmlichen Nasenabstrichtupfer gewonnen werden können (46). Um diese Konzentration zu erreichen, wurden zunächst Verdünnungsreihen ausgehend von einer 0,1 McFarland-Standard-Trübung angelegt. Diese ergaben in 10er Verdünnungsschritten mit anschließendem Ausstreichen auf Columbia-Blut-Agar eine Keimzahl von 10<sup>3</sup> bei einer Verdünnung von 1:10.000.

### 2.2.1 Kultureller Nachweis und Resistenztestung von MRSA

Für den kulturellen Nachweis von MRSA aus Abstrichen wurden diese nach ihrer Gewinnung und ihrem Transport in einem geeigneten Transportmedium zum einen direkt auf Columbia-Blut-Agar ausgestrichen, zum anderen in eine Dextrose-Anreicherungsbouillon gegeben, die nach 24 h ebenfalls auf Columbia-Blut-Agar ausgestrichen wurde. Verdächtige Kolonien wurden isoliert, eine Gramfärbung und ein Katalase-Test durchgeführt sowie auf das Vorhandensein gebundener und freier Koagulase überprüft. Grampositive, Katalase- und Koagulase-positive Isolate wurden mittels E-Test auf die phänotypische Resistenz gegenüber Oxacillin untersucht. Weiterhin wurde eine Speziesdiagnostik mittels Api ID 32 Staph durchgeführt, um eine biochemische Abgrenzung zu anderen Staphylokokken Spezies zu ermöglichen.

### 2.2.2 Anreicherung des Abstrichmaterials mittels Selektivmedium

Für eine möglichst spezifische Anreicherung von MRSA bereits vor der IMS wurde ein zusätzlicher Anreicherungsschritt eingesetzt. Dazu wurde die Enschede-Bouillon eingesetzt (Pepton-Mannitol-Bouillon mit 1 mg/ml Cefoxitin und 2 mg/ml Aztreonam, Herstellung durch das Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Enschede, Niederlande), in der 1 ml der Keimsuspension ( $10^3$  Bakterien pro ml je Spezies) für 6 h bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde für die IMS 1 ml der Bouillon weiter verwendet bzw. ein mit Bouillon voll gesogener Abstrichtupfer für den kulturellen Nachweis von MRSA eingesetzt (s.o.).

### 2.2.3 Durchführung der immunomagnetischen Separation

Zunächst wurde 1 ml der Keimsuspension in ein Reaktionsgefäß gegeben und 1,5 µl Anti-Protein A Antikörper (Sigma) hinzu pipettiert. Die Proben wurden für 30 min. bei Raumtemperatur in dem Rotary Shaker (Dynal, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 min. bei 5000 g zentrifugiert; der Überstand wurde abpipettiert; da jedoch kein Pellet sichtbar wurde, wurden nur 980 µl vorsichtig abgenommen (unter strenger Vermeidung von



Wandkontakt). Die verbliebenen 21,5 µl mit dem nicht sichtbaren Pellet wurden mit 200 µl PBS-Tween (Sigma) versetzt. Nun wurden 20 µl der nach Herstellerangaben (Dynal) vorbereiteten Dynabeads hinzu gegeben und erneut für 30 min. bei Raumtemperatur in dem Rotary Shaker inkubiert. Die an die magnetischen Partikel gebundenen Bakterienzellen hafteten nach diesem Schritt seitlich im Reaktionsgefäß. Der Überstand konnte somit abgenommen werden. Abschließend wurden die Proben insgesamt dreimal mit jeweils 1 ml PBS-Tween ausgewaschen. Danach wurde der Magnet entfernt, die Bakterienzellen in 10 µl PBS-Tween resuspendiert. Die 10 µl wurden vollständig auf eine Columbia-Blut-Agarplatte mittels 8-Ösen-Ausstrich ausplattiert und für 12 h bei 37°C inkubiert.

#### 2.2.4 Durchführung der DNA-Extraktion

Für den genotypischen PCR-Nachweis des *mecA* und *nuc* Gens wurde vorbereitend die DNA aus dem nach der IMS erhaltenen Koloniematerial isoliert. Hierbei wurde das Verfahren nach van Embden et al. eingesetzt (50). Das Koloniematerial wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 400 µl Tris-EDTA (Tris-HCl, 10 mM; EDTA, 1 mM; pH 7,0) Puffer homogenisiert und anschließend 30 min. bei 80°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum konnte von der Inaktivierung sämtlicher Mikroorganismen ausgegangen werden. Inkubationen mit Lysozym bei 37°C für 1-24 h und 10%ige SDS/Proteinase K-Lösung bei 65°C für 10 min. schlossen die Zellwand auf. Eine ebenfalls bei 65°C stattfindende zehnmündige Behandlung mit 5 M NaCl-Lösung sowie N-Acethyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)/NaCl-Lösung band Zellwandtrümmer, überschüssige Polysaccharide und Proteine. Die DNA wurde durch 5 min. Zentrifugation (14.000 g) mit Chloroform/Isoamylalkohol von den Zellfragmenten abgetrennt und in ein neues Gefäß überführt. Dort präzipitierte die DNA in Isopropanol nach halbstündiger Inkubation bei -20°C. Anschließend wurde für 10 min. bei 14.000 g zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde die DNA getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer gelöst um bei -20°C bis zum Beginn der PCR eingefroren zu werden.

### 2.2.5 Durchführung des genotypischen Nachweises (PCR) von MRSA

Die PCR ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte. Anfangs- und Endpunkte des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes werden nach Auftrennung (Denaturierung) des als Vorlage (Template-DNA) dienenden DNA-Doppelstranges durch Erwärmung mit zwei hinzu gegebenen Oligonukleotidprimern markiert. Diese binden komplementär an die bekannten Anfangs- und Endsequenzen (Anlagerung der Primer). Von diesem doppelsträngigen Startpunkt wird durch die thermostabile Taq-Polymerase eine Kettenverlängerung komplementär zum DNA-Matrizenstrang durchgeführt (Elongation). Eine Temperaturerhöhung auf 72°C verschafft optimale Bedingungen für die Synthese der DNA durch die Taq-Polymerase. Durch zyklische Temperaturänderungen wird der neu entstehende DNA-Doppelstrang wieder aufgetrennt, Primer und DNA-Polymerase können erneut binden. So wird zunächst linear und ab dem zweiten Zyklus eine exponentielle Vermehrung der Template-DNA erreicht. Um unspezifische Amplifikate zu reduzieren, wurde ein „Hot-Start“ durchgeführt, bei dem die Template-DNA erst hinzugefügt wurde, als der Thermocycler eine Temperatur von 80°C erreicht hatte. Im Anschluss daran wurde die eigentliche PCR-Reaktion gestartet. Als Positivkontrolle diente die Ganzzell-DNA vom Referenzstamm *S. aureus* ATCC 43300, während die Reagenzienkontrolle aus dem Reaktionsansatz ohne Template-DNA besteht. Zusätzlich wurden noch zwei weitere Negativkontrollen mitgeführt, die aus bekannt negativen *S. aureus* (ATCC 25923) für *mecA* bzw. *S. epidermidis* (ATCC 12228) Stämmen für *nuc* bestanden. Das PCR-Produkt konnte mit Hilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen werden (siehe 2.2.6).

Reaktionsansatz einer PCR zum Nachweis des *mec A* und *nuc* Gens:

5 µl (10-100 ng)	Template-DNA
5 µl	10x PCR-Puffer
3 µl (25 mM)	MgCl <sub>2</sub>
1 µl (10 mM)	dNTP-Mix
2 µl (10 pmol)	forward Primer (MEC 5 oder NUC 1)
2 µl (10 pmol)	reverse Primer (MEC 6 oder NUC 2)
0,25 µl (1,25 U)	Taq DNA-Polymerase
Ad 50 µl	Aqua dest.

Die PCR wurde in einem T1/T1 Gradient Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Hierbei wurde die folgende Programmierung eingesetzt:

Hot-Start bei 80°C, danach 30 Zyklen: 60 s: 95°C / 60 s: 59°C / 120 s: 72°C.

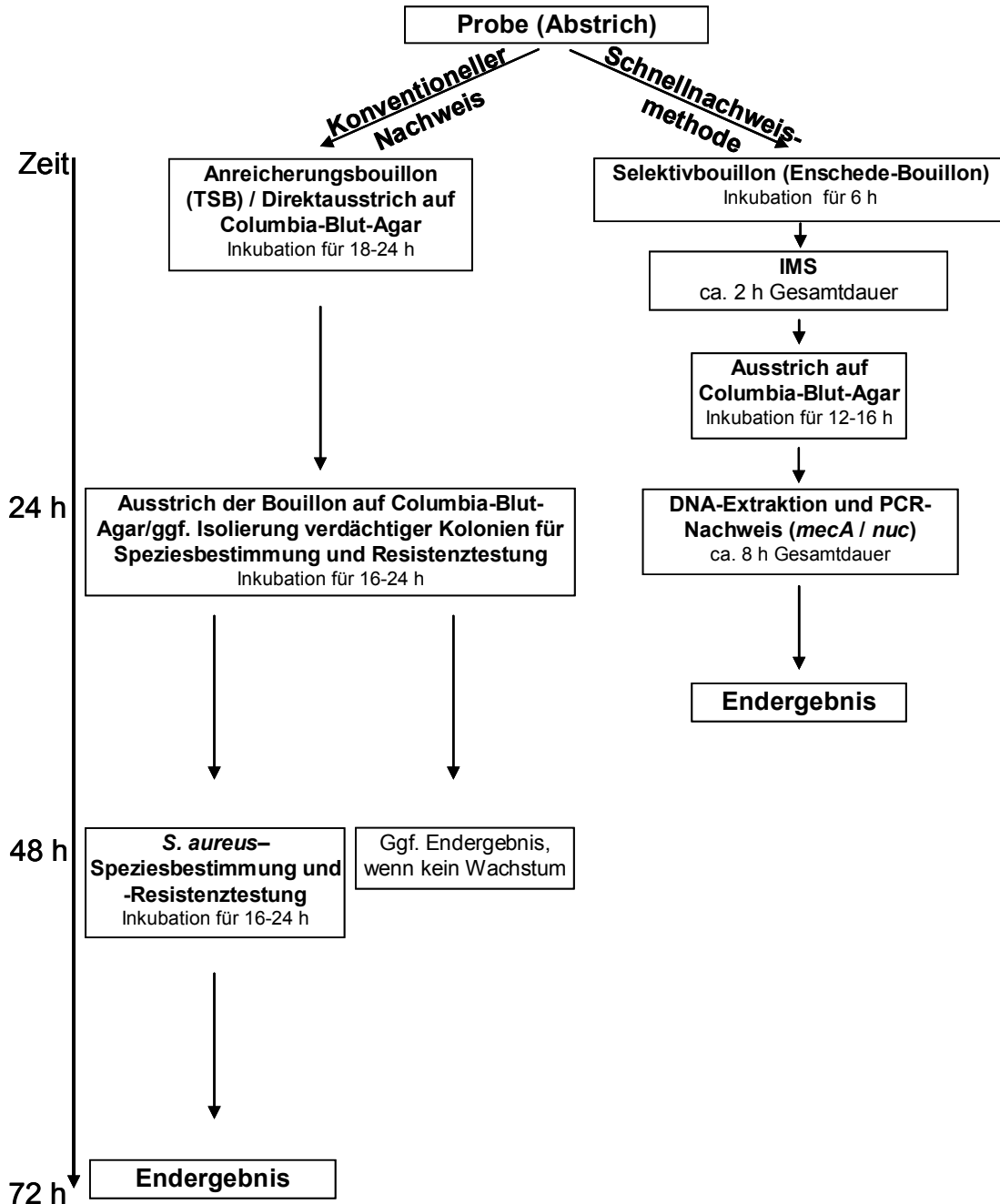
Das Programm wurde mit einer abschließenden verlängerten Elongationsphase von 10 min. bei 72°C abgeschlossen.

### 2.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung und Färbung von DNA

Die Gelelektrophorese wurde zum Nachweis des PCR-Produktes durchgeführt. Hierbei wurde ein 1,5%iges Agarosegel mit einem Mix aus 8 µl PCR-Produkt + 2 µl Probenpuffer (Blaumarker) in die vorgegebenen Taschen beschickt. Zusätzlich wurde neben der Negativkontrolle auch ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt, der sich aus 0,25 µl 1 kB-Marker (Eppendorf), 4,75 µl Aqua dest. und 1 µl 6-fach Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25 Xylencyanol FF, 15% Ficoll) zusammensetzte. Das in einer mit TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer befindliche Agarosegel wurde für 60 min. an eine 110 V starke Stromquelle angeschlossen, bis die Blaumarker-Banden ca. 2/3 des Gels durchlaufen hatten. Anschließend wurde das Agarosegel zur Darstellung der DNA-Fragmente mit dem interkalierenden DNA-Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Hierzu wurde das Gel 20 min. in einer 0,1%igen Ethidiumbromid-Lösung (lichtgeschützt) gefärbt und danach 20 min. in einem Wasserbad gewässert. Die Detektion und Dokumentation der

PCR-Produkte erfolgte unter UV-Licht (302 nm) mit der Geldokumentationsanlage (Biorad).

### 2.3 Gesamtablauf des MRSA-Nachweises



## 2.4 Verwendete Referenzstämme und klinische Isolate

Zur Etablierung und Evaluierung der IMS wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Stammsammlungsstämme sowie ausgewählte klinische Isolate verwendet. Die klinischen Isolate stammen aus Surveillance-Abstrichen und aus Infektionsisolaten, die während der Routinearbeiten am Institut für Medizinische Mikrobiologie oder am Institut für Hygiene isoliert und deren Spezies und Resistenzverhalten mittels biochemischer und molekularbiologischer Untersuchungen bestätigt wurden.

Genus	Spezies	Stammsammlungsbezeichnung <sup>a</sup>	Kommentar
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	ATCC 43300	MRSA
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	ATCC 25923	MSSA
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	K2463*	MRSE
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	ATCC 12228	MSSE
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	ATCC 29212	
<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i>	ATCC 19615	
<i>Streptococcus</i>	<i>viridans</i>	KI 02*	
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	ATCC 7468	
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	ATCC 6051	
<i>Neisseria</i>	sp. (apathogen)	KI 01*	
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	ATCC 15313	
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	ATCC 27853	
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	ATCC 25922	
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	ATCC 35659	
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	ATCC 13883	

Tabelle 2.2 Verwendete Referenzstämme und klinische Isolate zur Etablierung und Evaluierung der IMS. <sup>a</sup>ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, USA;

\*klinische Isolate aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie oder Institut für Hygiene des UKM

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der immunomagnetischen Separation

#### 3.1.1 Sensitivitätstestung

Um herauszufinden, bis zu welcher Anzahl von Keimen pro ml die IMS noch eine spezifische Detektion ermöglicht, wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. Hierzu wurde der *S. aureus* ATCC 25923 in einer 0,9%igen NaCl-Lösung auf einen McFarland von 0,1 eingestellt (entspricht ca.  $10^7$  KBE pro ml), eine 1:10-Verdünnungsreihe angelegt und anschließend jeweils 10  $\mu$ l der Lösungen mittels 8-Ösen-Ausstrich ausplattiert, um die Anzahl der KBE zu überprüfen. Anschließend wurde die IMS durchgeführt und die resultierenden KBE nach der IMS gezählt. Diese Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt. In Tabelle 3.1 sind die Mittelwerte der ermittelten KBE nach Durchführung der IMS der jeweiligen Verdünnungen dargestellt. Zusammengefasst ergab sich hierbei für die IMS eine Nachweisgrenze vor ca.  $10^2$  KBE pro ml. Bei einer höheren Verdünnung ( $10^1$  KBE pro ml) ließen sich keine Kolonien mehr reproduzierbar nachweisen.

Vor IMS eingesetzte <i>S. aureus</i> KBE	Mittelwert <i>S. aureus</i> KBE nach IMS aus 3 Untersuchungen
$10^7$	Rasenwachstum
$10^6$	Rasenwachstum
$10^5$	Rasenwachstum
$10^4$	1893
$10^3$	489
$10^2$	23

Tabelle 3.1 Verdünnungsreihe des *S. aureus* ATCC 25923 zur Bestimmung der Nachweisgrenze der IMS.

3.1.2 Nachweis der spezifischen Anreicherung von *S. aureus* durch die IMS  
 Um die Spezifität der IMS zu überprüfen, wurden verschiedene Bakterienspezies alleine und in Kombinationen aus unterschiedlichen Bakterienspezies mit dem *S. aureus* ATCC 25923 der IMS unterzogen. Die Auswahl der getesteten Bakterienspezies und der verschiedenen Kombinationen wurde in Anlehnung an die zu erwartenden Kombinationen bei humanen Nasen- und anderen Haut- und Schleimhautabstrichen getroffen. In den Abbildungen 3.1 und 3.2 sind die verschiedenen Bakterienspezies alleine und die verschiedenen Kombinationen mit den eingesetzten KBE der einzelnen Spezies und die nach IMS resultierenden KBE sowie der Anteil (in %) an KBE nach IMS angegeben.

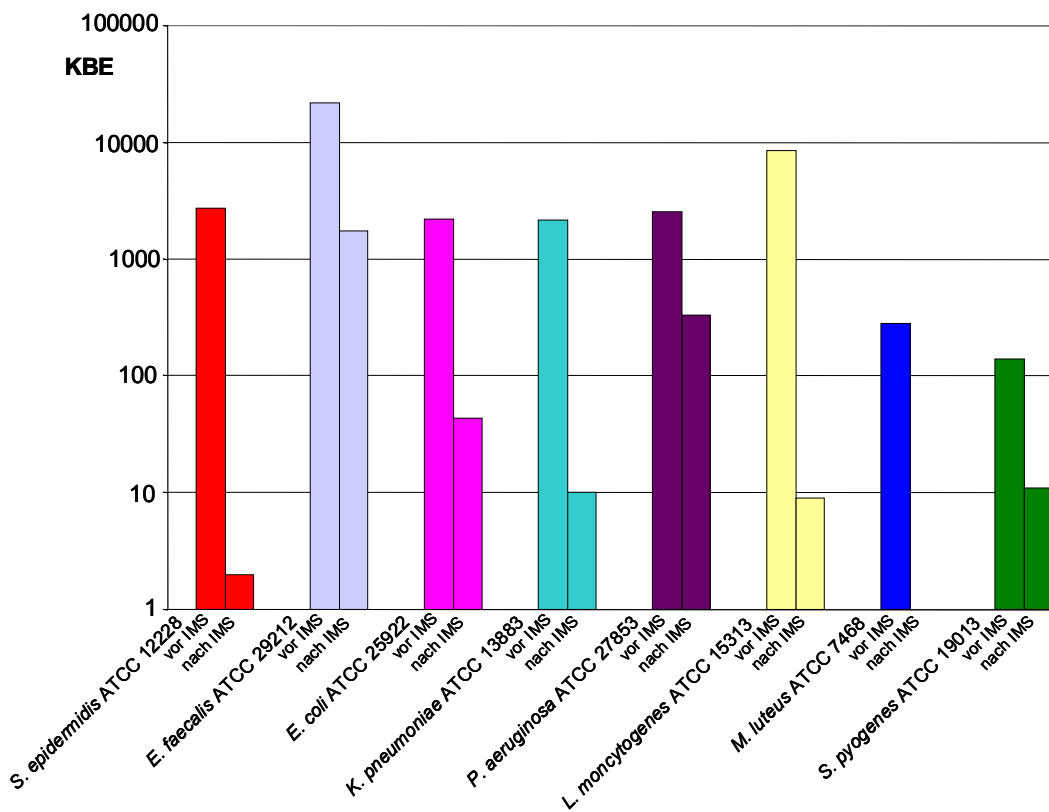


Abbildung 3.1 Aufstellung der verschiedenen getesteten Bakterienspezies in der IMS mit den korrespondierenden KBE vor und nach IMS.

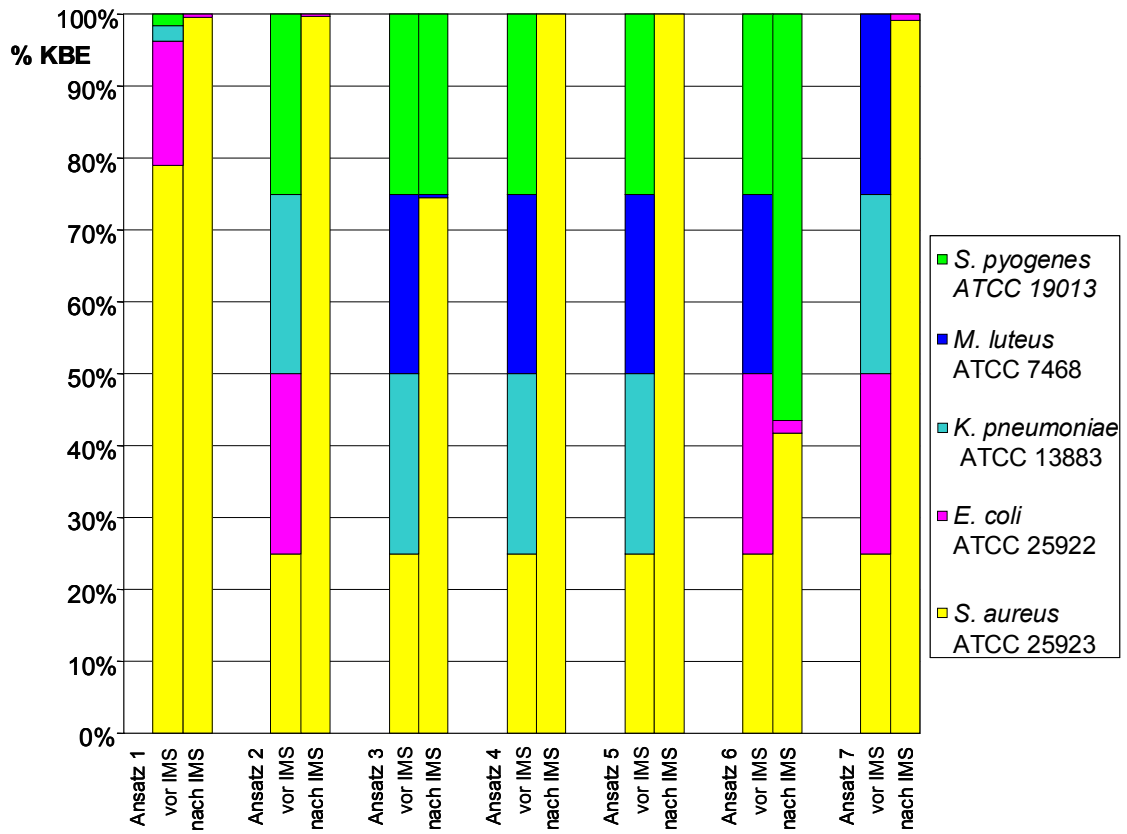


Abbildung 3.2 Aufstellung der verschiedenen getesteten Bakteriengemische in der IMS mit den korrespondierenden % KBE vor und nach IMS.



Abbildung 3.3 zeigt einen 8-Ösen-Austrich vor und nach Enschede-Bouillon und Durchführung der IMS. Hierbei wurden eine Reduktion der Hintergrundflora und damit eine relative Anreicherung des *S. aureus* deutlich.

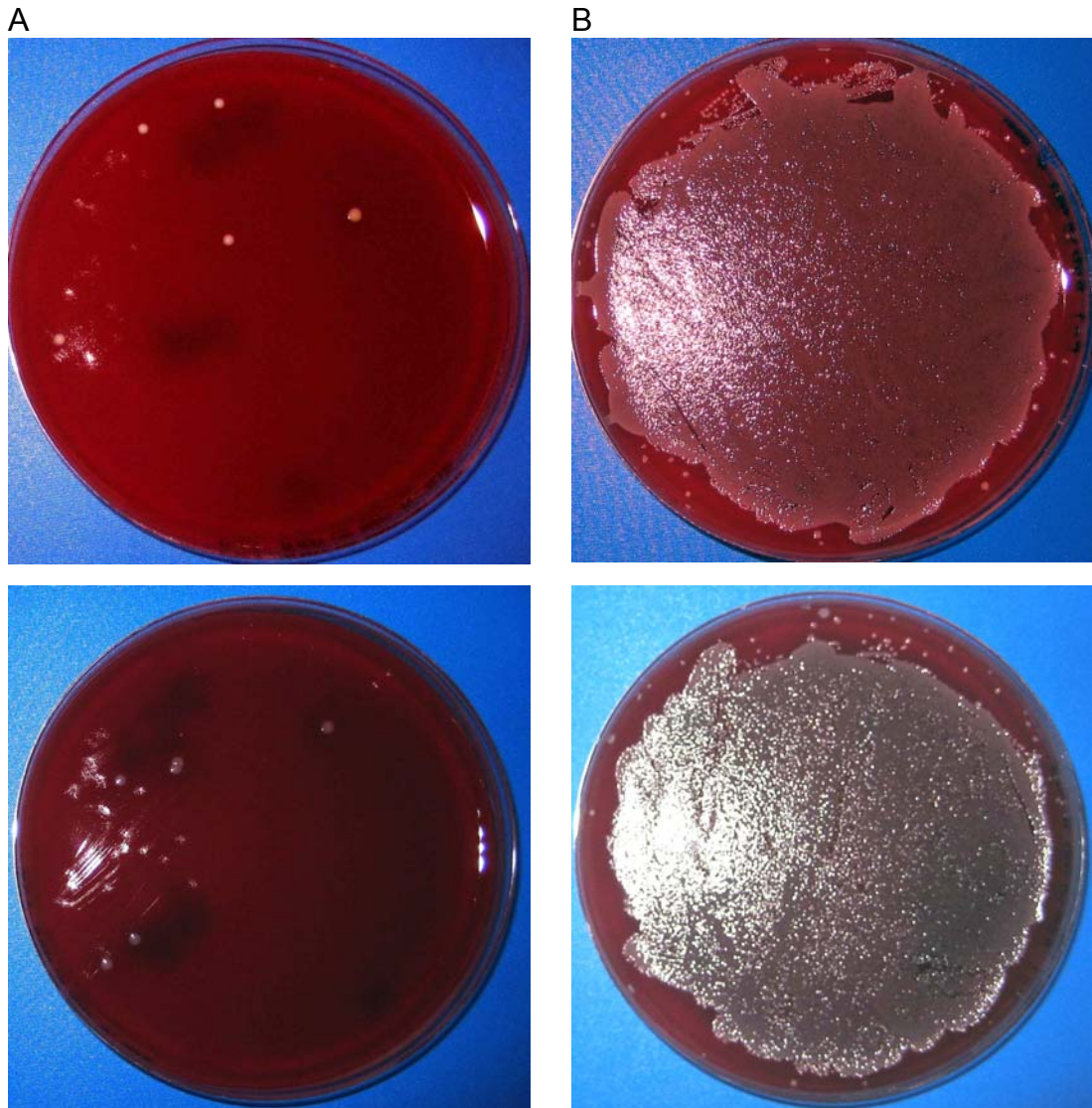


Abbildung 3.3 8-Ösen-Ausstriche von zwei exemplarischen Bakteriengemischen (A) vor und (B) nach *S. aureus*-spezifischer IMS.

### 3.1.3 Differenzierung zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* mittels IMS und PCR

In dieser Versuchsreihe wurde die Fähigkeit der IMS in Kombination mit der PCR untersucht, in wie weit zwischen resistenten bzw. sensiblen *S. aureus* und *S. epidermidis* differenziert werden kann. Ist dies möglich, kann direkt im

Anschluss an die IMS ohne weitere Kontrolle einer möglichen Verunreinigung die molekulare Bestätigung in Form einer PCR mit Gennachweisen von *nuc* und *mecA* durchgeführt werden. In der Tabelle 3.2 ist diese Versuchsreihe aufgelistet, bei der verschiedene Kombinationen aus MRSA, MSSA, MRSE und MSSE mit typischen Haut- und Schleimhautkeimen getestet wurden.

Ansatz Nr.	Eingesetzte Bakterienspezies vor IMS <sup>a</sup>	Ergebnis nach IMS und PCR
1	MRSA, MSSA, MSSE	Nachweis von MRSA
2	MRSA, MSSA, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Nachweis von MRSA
3	MRSA, MSSA	Nachweis von MRSA
4	MRSA, MSSA, <i>E. coli</i> ATCC 25922	Nachweis von MRSA
5	MSSA, MRSE, <i>E. coli</i> ATCC 25922	Nachweis von MRSA
6	MSSA, MRSE	Nachweis von MRSA

Tabelle 3.2 Differenzierung zwischen verschiedenen *S. aureus* (MRSA [ATCC 43300] und MSSA [ATCC 25923]) und *S. epidermidis* (MRSE [K2463] und MSSE [ATCC12228]) mittels IMS und anschließender PCR. <sup>a</sup>In allen Ansätzen waren zusätzlich jeweils die typischen Vertreter von Haut- und Schleimhautkeimen (*Neisseria* sp. (apathogen) KI 01, *B. subtilis* ATCC 6051, *S. viridans* KI 02, *M. luteus* ATCC 7468) vorhanden.

Die Ansätze Nr. 5 und 6 sind falsch positiv. Der Nachweis des *mecA* und des *nuc* Gens begründet sich in der Kombination aus einem sensiblen *S. aureus* (*nuc* Gennachweis) mit einem resistenten *S. epidermidis* (*mecA* Gennachweis).

### 3.2 Testung der IMS mittels klinischer Isolate

Um die Fähigkeit der IMS unter Routinebedingungen zu testen, wurden parallel zur phänotypischen Routinediagnostik des Instituts für Hygiene 20 Nasenabstriche von freiwilligen Versuchspersonen (Mitarbeiter des UKM), die im Rahmen von Surveillance-Untersuchungen gewonnen wurden, mittels IMS und genotypischer Bestätigung untersucht. Dabei wurden nach der IMS jeweils alle angewachsenen Kolonien in der PCR eingesetzt (Tabelle 3.3).

	Diagnostik mittels Schnellnachweis		Konventionelle Routinediagnostik	
	Anzahl	Dauer (in h)	Anzahl	Dauer (in h)
Nachweis von				
MRSA	1	36	0	72
MSSA	7	36	4	72
Kein Nachweis von				
MRSA/MSSA	12	36	16	48
Durchschnittliche Verarbeitungsdauer (in h)		36		52,8

Tabelle 3.3 Untersuchung von 20 Surveillance-Kulturen (Nasenabstriche) auf MRSA und MSSA mittels Schnellnachweis sowie Vergleich mit den Ergebnissen der konventionellen Routinediagnostik.

Die Untersuchung der 20 Nasenabstriche ergab sieben Nachweise von MSSA mittels IMS und PCR sowie einen MRSA-Nachweis, der allerdings kulturell nicht bestätigt werden konnte. Dagegen konnte mit den rein phänotypischen Verfahren nur vier MSSA nachgewiesen werden. In den übrigen Nasenabstrichen ließen sich keine MRSA oder MSSA nachweisen. Die durchschnittliche Verarbeitungsdauer bis zum Endergebnis betrug beim Schnellnachweis unabhängig vom Ergebnis jeweils 36 Stunden, während die phänotypischen Untersuchungen - abhängig von eventuellen Isolierungs- und Subkultivierungsschritten - durchschnittlich 52,8 Stunden (48 bis 72 Stunden) dauerten (Tabelle 3.3).

### 3.3 Kombination von IMS und Anreicherungsbouillon

Im letzten Schritt wurde zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität ein Anreicherungsschritt in Form einer Selektivbouillon für MRSA der IMS vorgeschaltet. Hierzu wurde die Enschede-Bouillon verwendet, in die vor der IMS das Material für 6 h bebrütet wurde. Insbesondere sollen durch diesen Schritt MRSE eliminiert werden, die ebenfalls das *mecA* Gen tragen und damit zu falsch positiven Ergebnissen führen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden 36 unterschiedliche Kombinationen von Bakterienspezies wieder

mittels IMS und PCR unter Verwendung der Selektivbouillon analysiert (Tabelle 3.4). Dabei wurden jeweils  $10^3$  KBE MRSA eingesetzt. Zum Vergleich wurde wieder parallel die konventionelle phänotypische Diagnostik, zunächst ohne (Proben 1-12) Selektivbouillon, eingesetzt. Da hierbei kein einziger MRSA nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend für die Proben 13 bis 36 auch hier die Selektivbouillon eingesetzt (ohne Selektivbouillon waren auch die Proben 13-36 alle negativ).

	Anzahl der „positiven“ Proben	Ergebnis nach	
		Schnellnachweis- methode	Konventioneller Nachweis
Nachweis von			
MRSA	14	14	7
MSSA	19	19	12
Kein Nachweis von			
MRSA/MSSA	3	3	17

Tabelle 3.4 Ergebnisse der Evaluierung der Schnellnachweisemethode und der Vergleich mit dem konventionellen Nachweis bei 36 unterschiedlichen Bakterienkombinationen zusammengesetzt aus den verschiedenen klinischen und Referenzstämmen (s. Tabelle 2.2).

Die Verwendung der Enschede-Selektivbouillon ermöglichte den Nachweis aller MRSA (Tabelle 3.4). Darüber hinaus wurde das Wachstum von MRSE als mögliche Ursache für falsch-positive PCR-Ergebnisse unterdrückt, da keine der 15 Proben mit einer Kombination aus MSSA und MRSE ein falsch positives Ergebnis für einen MRSA-Nachweis ergab. Somit lässt sich eine Spezifität und Sensitivität von 100% für die Kombination Enschede-Bouillon/IMS/PCR (Schnellnachweismethode) berechnen. Daraus abgeleitet sind der positive und negative prädiktive Wert (PPV/NPV) ebenfalls jeweils 100%. Im Gegensatz dazu betragen bei gleicher Spezifität und PPV (100%) die Sensitivität und der NPV für die konventionelle phänotypische Diagnostik in Kombination mit der Enschede-Bouillon nur 50% und 75,9% (Tabelle 3.5).

	Schnellnachweismethode (%)	Konventioneller Nachweis (%)
Spezifität	100	100
Sensitivität	100	50
PPV	100	100
NPV	100	75,9

Tabelle 3.5 Aufstellung der Spezifität, Sensitivität, positivem und negativem prädiktiven Wert (PPV, NPV) der Schnellnachweismethode und des konventionellen Nachweises.

## 4 Diskussion

Aufgrund der zunehmenden Anzahl multimorbider Patienten, immer aufwändigeren und invasiveren Therapieverfahren sowie Veränderungen der Alterspyramide der Bevölkerung hin zu immer älteren Menschen sind immer mehr Patienten zu den Risikopatienten zu zählen, die eine Infektionen mit multiresistenten Erregern, wie MRSA oder Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) bekommen können.

Somit ist der möglichst schnelle Nachweis bzw. Ausschluss einer Kolonisation bzw. Infektion mit einem multiresistenten Erreger heutzutage eine der wichtigsten Aufgaben in der Infektiologie und Krankenhaushygiene, da die Hygienemaßnahmen entsprechend angepasst werden müssen, um eine Weiterverbreitung auf andere Patienten zu verhindern und ggf. eine adäquate Therapie einleiten zu können. Zudem führt eine Reduktion von multiresistenten Erregern durch entsprechende Sanierungsmaßnahmen zu einer Verbesserung der Versorgungsqualität und Verringerung der Morbidität und Mortalität der Patienten, da z.B. nicht-isolierte Patienten häufiger vom medizinischen Personal gesehen werden und Infektionen mit nicht-resistenten Erregern ein besseres Outcome haben (7, 8, 12).

So wurde im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit eine Schnellnachweismethode für MRSA als Alternative zu bisherigen konventionellen phänotypischen Methoden evaluiert. Diese Methode kann sowohl für Screeninguntersuchungen, z.B. bei Aufnahme eines Patienten, oder im Rahmen von Ausbruchsuntersuchungen, als auch zur Kontrolle eines Sanierungserfolgs von Patienten und Personal genutzt werden. Damit ist es möglich, für Patienten die Isolationsdauer um ein bis zwei Tage zu reduzieren und ggf. gesperrte Betten schneller wieder für andere Patienten zu öffnen. Ehemals MRSA-positives Personal kann nach einer Sanierungstherapie auch entsprechend schneller wieder im patientennahen Bereich arbeiten. Mit einer Kombination aus der immunomagnetischen Separation (IMS) mit einer für MRSA selektiven Anreicherungsbouillon zum spezifischen Nachweis von MRSA konnte eine Alternative zu bisherigen Verfahren neu etabliert werden.

Zunächst wurde die IMS ohne eine selektive Anreicherungsbouillon eingesetzt, um den Anteil von *S. aureus* zu erhöhen und gleichzeitig die Hintergrundflora möglichst stark zu unterdrücken. Je nach eingesetzten Mischkulturen aus *S. aureus* und Keimen des normalen Haut- und Schleimhautspektrums konnten zwischen 87 und 100% der Hintergrundflora unterdrückt werden. Dabei war der jeweilige Verlust von *S. aureus* durch die IMS deutlich geringer, sodass eine drei- bis 33fache relative Anreicherung von *S. aureus* resultierte. Dabei war die Nachweisgrenze von *S. aureus* mit  $10^2$  KBE pro ml deutlich unter den geforderten  $10^3$  KBE, die normalerweise in einem Nasenabstrich zu erwarten sind (14, 46). In diesem Bereich liegen auch die Erfahrungen anderer Autoren, die ebenfalls von  $10^2$  KBE als Nachweisgrenze der IMS ausgehen (23).

Im Anschluss an die IMS wurde zunächst direkt eine PCR zum Nachweis des für die Methicillinresistenz kodierenden Gens *mecA* und für das *S. aureus* spezifische Nukleasegen *nuc* durchgeführt. Da das *mecA* Gen nicht spezifisch für *S. aureus* ist und auch in anderen Staphylokokkenspezies nachgewiesen werden kann, führte diese Kombination zu einigen falsch positiven Ergebnissen, wenn z.B. ein MSSA in Kombination mit einem MRSE nach der IMS untersucht wurde. So ist es sinnvoll, diese Kombination nur beim Einsatz von Reinkulturen einzusetzen, wobei das *nuc* Gen dann nur noch als interne Kontrolle dient. Anders ist die Situation, wenn direkt vom Abstrichtupfer eine PCR durchgeführt wird oder wenn keine Reinkultur vorliegt. Dann sind falsch positive Ergebnisse zu erwarten. So beruht z.B. der kommerzielle Lightcycler MRSA-Schnelltest von Roche auf einem kombinierten Nachweis des Resistenzgens mit einem weiteren Gen zur Speziesbestimmung (37). Die Evaluierung dieses und vergleichbarer Tests zeigte deutlich die beschriebene Problematik und führte dazu, dass derartige Verfahren nur als Kulturbestätigungstests oder zur Ausschlussdiagnostik hilfreich sind. Jedes positive Testergebnis, das direkt aus einem klinischen Material entstanden ist, sollte deshalb kritisch hinterfragt und ggf. kulturell bestätigt werden (42, 44). Kürzlich wurde dies von Becker und Kollegen bestätigt, die untersuchten, wie häufig Kokolonisationen von MSSA und anderen *mecA*-positiven Staphylokokkenspezies in Surveillanceabstrichen der Nase vorkommen.

Obwohl nur ein geringer Prozentsatz aller Proben eine Kokolonisation aufwies (3,4%), konnte nur ein niedriger PPV von ca. 40% erreicht werden, der zumindest in Regionen mit einer niedrigen MRSA-Prävalenz einen Direktnachweis ohne parallelen kulturellen Nachweis nicht sinnvoll erscheinen lässt (1).

Die Problematik der falsch positiven Ergebnisse aufgrund von Mischkulturen aus MSSA und MRSE wurde auch im Verlauf der vorliegenden Arbeit berücksichtigt, da ohne eine der IMS vorgeschalteten Selektivbouillon zunächst falsch positive Ergebnisse entstanden (Tabelle 3.2). Erst der Einsatz einer für MRSA selektiven Anreicherungsbouillon führte zur Elimination der falsch positiven Ergebnisse durch MSSA in Kombination mit MRSE. Denn bereits durch die selektive Anreicherungsbouillon konnte das Wachstum von MRSE vollständig unterdrückt und in Kombination mit der IMS somit eine Spezifität von 100% erreicht werden. Dass der Einsatz der Selektivbouillon zudem zu einer höheren Nachweissensitivität führte, wurde v.a. bei der phänotypischen Diagnostik deutlich, da ohne Selektivbouillon kein einziger MRSA in den 36 verschiedenen Bakteriengemischen nachgewiesen wurde; erst mit selektiver Anreicherungsbouillon konnten 7 von 11 MRSA sicher detektiert werden (Tabelle 3.4).

Auf dem Markt gibt es eine Vielzahl von anderen phänotypischen Methoden, die auf speziellen, für MRSA selektiven Festnährmedien basieren (z.B. MRSA ID von bioMérieux oder ORSAB von Oxoid). Diese beinhalten meist Antibiotika zur Unterdrückung der Hintergrundflora sowie zur Selektion von MRSA einen Farbindikator, der das MRSA Wachstum deutlich von anderen nicht-MRSA Kolonien abgrenzen lässt. Allerdings haben diese Festmedien alle den Nachteil einer Bebrütungszeit von mindestens 24 Stunden. Darüber hinaus ist in der Regel weitere Diagnostik zur Bestätigung des MRSA notwendig, da die Spezifität und Sensitivität bei der alleinigen Verwendung dieser Festnährmedien zu gering ist (35). Diese Erfahrungen konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, da die Untersuchungsdauer der konventionellen phänotypischen Diagnostik länger war und auch nicht alle MRSA sicher nachgewiesen werden konnten.



Insgesamt haben diese Erkenntnisse zu einer Weiterentwicklung der kommerziell angebotenen MRSA-Schnellnachweise, die meist auf einer PCR-Amplifikation beruhen, geführt. So wurde kürzlich ein neues genetisches Target, *orfX*, eingeführt, das spezifisch für *S. aureus* ist und direkt benachbart (im 3'-Bereich) zur SCCmec-Kassette im Genom von *S. aureus* liegt (19). Werden nun Amplifikationsprimer so gewählt, dass sie zum einen in der SCCmec-Kassette und zum anderen im *orfX* binden, ist theoretisch der spezifische Nachweis eines MRSA auch aus einer Mischkultur möglich (9, 20, 21). Die Evaluierung dieser Tests ergab gute Sensitivitäten und Spezifitäten; allerdings ist bis heute nicht geklärt, wie Befunde interpretiert werden müssen, bei denen zwar im Schnelltest ein MRSA nachgewiesen wurde, dieser aber nicht kulturell bestätigt werden kann. Aufgrund der hohen Nachweissensitivität der meist auf real-time-PCR-Technologien beruhenden Tests ist der fehlende kulturelle Nachweis nur eine mögliche Erklärung. Ein anderer Erklärungsversuch für kulturell negative MRSA-Schnelltestergebnisse ist die Möglichkeit, dass zwar eine SCCmec-Kassette in einem *S. aureus* nachgewiesen wurde, diese aber *mecA* verloren hat und damit phänotypisch nicht mehr als MRSA bestätigt werden kann (6, 10).

Ein Vorteil der hier evaluierten Schnellnachweismethode besteht darin, dass sie ohne teure und aufwändige Technologie (im Gegensatz zu z.B. Realtime-PCR-Verfahren) auskommt und somit leicht in den Alltag auch kleinerer Labore integriert werden kann. Ein weiterer Vorteil der Methode ist, dass nach der IMS eine Kultur vorliegt. Diese kann zum einen natürlich mittels unterschiedlicher Tests (hier mittels *mecA/nuc*-PCR) als MRSA bestätigt werden, zum anderen liegt sie für weiterführende Untersuchungen vor. So ist eine anschließende Resistenztestung genauso möglich wie eine Typisierung, um die Epidemiologie des MRSA weiter aufzuklären. Gerade diese Möglichkeiten sind ein großer Vorteil gegenüber Direktnachweisverfahren, denn neben dem schnellen MRSA-Nachweis gewinnt die Subtypisierung von MRSA immer größere Bedeutung. So ist häufig die MRSA-Bestätigung nur der erste Schritt in einer umfangreichen MRSA-Diagnostik, die immer mehr auf die Erkennung hochpathogener Klone fokussiert ist. Hauptgrund hierfür ist

sicherlich die weltweite Verbreitung von cMRSA, die schwerste Infektionen in der gesunden Normalbevölkerung verursachen (16, 34, 47). Während der Anteil dieser cMRSA in Europa noch relativ gering ist und nur ca. 1-4% aller MRSA ausmacht (15, 51), gibt es in den USA regional bereits cMRSA-Raten von bis zu 30% aller MRSA-Infektionen (18). Um diese Erreger von anderen MRSA zu differenzieren, ist deshalb das Vorliegen einer Reinkultur essentiell. Die Anforderung gilt auch für die Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks z.B. durch eine Pulsfeld-Gelelektrophorese (33, 41) oder durch partielle Sequenzierung des *S. aureus* Protein A Gens (*spa* Typisierung), um Verwandtschaftsbeziehungen zwischen einzelnen MRSA darstellen zu können und daraus Transmissionswege und Hygienemaßnahmen ableiten zu können (29, 30).

Das frühzeitige Erkennen einer MRSA-Kolonisation und -Infektion durch ein möglichst schnelles und sicheres Nachweisverfahren könnte zudem im Rahmen krankenhaushygienischer Präventionsmaßnahmen die Weiterverbreitung verhindern. Damit wäre neben der wichtigen Händedesinfektion zur Unterbrechung einer möglichen Infektionskette durch Personal (36), die Einführung baulicher Rahmenbedingungen (beispielsweise ausreichende Anzahl von Einzelzimmern in Risikobereichen/Schleusen) und individuelle Schutzmaßnahmen wie Mundschutze bezahlbar (27). Lange Isolationszeiten von Patienten mit unklarem MRSA-Status könnten auf ein Minimum reduziert werden und somit eine Situation wie in den Niederlanden geschaffen werden, die neben der Kosteneffizienz auch eine niedrige MRSA-Rate ergeben würde (48). In der Konsequenz der Maßnahmen wird deutlich, dass die Prävention von MRSA-Infektionen neben dem medizinischen Nutzen deutliche Einsparungen zur Folge hätte (13, 17, 24, 39, 48).

Neben der krankenhaushygienischen und ökonomischen Relevanz von MRSA sind auch die infektiologischen Aspekte zu beachten. So wird die Forderung nach einem möglichst schnellen Nachweis bzw. Ausschluss einer MRSA-Kolonisation von der Tatsache unterstrichen, dass eine Kolonisation häufig der Ausgang für eine nachfolgende Infektion ist (52). Zudem ermöglicht der

schnelle MRSA-Nachweis bzw. –Ausschluss auch schneller eine angepasste Antibiotikatherapie. Im Vergleich zu MSSA- weisen MRSA-Infektionen eine höhere Morbidität und Mortalität auf (8). Dazu resultieren diese häufiger in einem verlängerten Krankenhausaufenthalt und in höheren Therapiekosten (13, 24, 31). Die höheren Therapiekosten sind zum einen mit der längeren Therapiedauer und aufwändigeren Hygienemaßnahmen, zum anderen mit dem Einsatz moderner Reserveantibiotika wie Linezolid, Daptomycin oder Tigecyclin zu erklären. Die dadurch geförderte Resistenzentwicklung ist heutzutage noch gar nicht abzusehen, aber bereits wenige Jahre nach Markteinführung von Linezolid wurden schon die ersten Resistenzen nachgewiesen. Dazu kommt, dass aufgrund eines unklaren MRSA-Status immer häufiger Reserveantibiotika als erste Wahl für eine empirische Therapie eingesetzt werden, um ein Therapieversagen bei vorliegender Resistenz zu vermeiden (26).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die hier neu etablierte und evaluierte Schnellnachweismethode, die eine Kombination aus Selektivbouillon mit IMS und PCR ist, eine schnellere und valide Alternative zu konventionellen, auf phänotypischen Eigenschaften basierenden MRSA-Nachweisverfahren ist. Zudem ermöglicht sie durch den Erhalt einer Kultur weitere Subtypisierungen wie z.B. die *spa* Typisierung. Weitere Studien mit einer größeren Anzahl klinischer Isolate und Vergleichsuntersuchungen mit genotypischen Direktnachweisen müssen in Zukunft zeigen, ob sie schließlich geeignet ist, die bisher verwendeten Methoden zu ersetzen.

## 5 Literaturverzeichnis

- (1) Becker K, Pagnier I, Schuhen B, Wenzelburger F, Friedrich AW, Kipp F, Peters G, von Eiff C (2006) Does nasal cocolonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determinations. J Clin Microbiol 44: 229-231.
- (2) Becker K, Roth R, Peters G (1998) Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J Clin Microbiol 36: 2548-2553.
- (3) Burkhardt F, Bauernfeind A (1992) Mikrobiologische Diagnostik. 6. Auflage. Thieme, New York.
- (4) Cavassini M, Wenger A, Jatou K, Blanc DS, Bille J (1999) Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 37: 1591-1594.
- (5) Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK (2003) Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med 348: 1342-1347.
- (6) Corkill JE, Anson JJ, Griffiths P, Hart CA (2004) Detection of elements of the staphylococcal cassette chromosome (SCC) in a methicillin-susceptible (*mecA* gene negative) homologue of a fucidin-resistant MRSA. J Antimicrob Chemother 54: 229-231.

- (7) Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y (2005) The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26: 166-174.
- (8) Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y (2003) Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 36: 53-59.
- (9) Cuny C, Witte W (2005) PCR for the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains using a single primer pair specific for SCCmec elements and the neighbouring chromosome-borne *orfX*. *Clin Microbiol Infect* 11: 834-837.
- (10) Deplano A, Tassios PT, Glupczynski Y, Godfroid E, Struelens MJ (2000) In vivo deletion of the methicillin resistance *mec* region from the chromosome of *Staphylococcus aureus* strains. *J Antimicrob Chemother* 46: 617-620.
- (11) Desjardins M, Guibord C, Lalonde B, Toye B, Ramotar K (2006) Evaluation of the IDI-MRSA assay for detection of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* from nasal and rectal specimens pooled in a selective broth. *J Clin Microbiol* 44: 1219-1223.
- (12) DiazGranados CA, Jernigan JA (2005) Impact of vancomycin resistance on mortality among patients with neutropenia and enterococcal bloodstream infection. *J Infect Dis* 191: 588-595.

- (13) Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, Fowler VG, Bronstein MZ, Trivette SL, Briggs JP, Sexton DJ, Kaye KS (2003) Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. Clin Infect Dis 36: 592-598.
- (14) Francois P, Pittet D, Bento M, Pepey B, Vaudaux P, Lew D, Schrenzel J (2003) Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. J Clin Microbiol 41: 254-260.
- (15) Friedrich AW, Witte W, Harmsen D, de Lencastre H, Hryniewicz W, Scheres J, Westh H (2006) SeqNet.org: a European laboratory network for sequence-based typing of microbial pathogens. Euro Surveill 11: E060112.4.
- (16) Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J, 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: 753-759.
- (17) Herr CEW, Heckrodt TH, Hofmann FA, Schnettler R, Eikmann TF (2003) Additional costs for preventing the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and a strategy for reducing these costs on a surgical ward. Infect Control Hosp Epidemiol 24: 673-678.
- (18) Hidron AI, Kourbatova EV, Halvosa JS, Terrell BJ, McDougal LK, Tenover FC, Blumberg HM, King MD (2005) Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. Clin Infect Dis 41: 159-166.

- (19) Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T (2002) Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol 292: 67-74.
- (20) Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, Gagnon F, Truchon K, Bastien M, Picard FJ, van Belkum A, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG (2004) New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J Clin Microbiol 42: 1875-1884.
- (21) Huletsky A, Lebel P, Picard FJ, Bernier M, Gagnon M, Boucher N, Bergeron MG (2005) Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in less than 1 hour during a hospital surveillance program. Clin Infect Dis 40: 976-981.
- (22) Hussain Z, Stoakes L, Garrow S, Longo S, Fitzgerald V, Lannigan R (2000) Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. J Clin Microbiol 38: 2051-2054.
- (23) Karch H, Janetzki-Mittmann C, Aleksic S, Datz M (1996) Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. J Clin Microbiol 34: 516-519.
- (24) Karchmer TB, Durbin LJ, Simonton BM, Farr BM (2002) Cost-effectiveness of active surveillance cultures and contact/droplet precautions for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect 51: 126-132.
- (25) Kipp F, Kahl BC, Becker K, Baron EJ, Proctor RA, Peters G, von Eiff C (2005) Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. J Clin Microbiol 43: 1956-1959.

- (26) Kresken M, Hafner D (1999) Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975-1995. Study Group Bacterial Resistance of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Infection* 27 Suppl 2: S2-8.
- (27) Lacey S, Flaxman D, Scales J, Wilson A (2001) The usefulness of masks in preventing transient carriage of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by healthcare workers. *J Hosp Infect* 48: 308-311.
- (28) Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339: 520-532.
- (29) Mellmann A, Friedrich AW, Kipp F, Hinder F, Keckevoet U, Harmsen D (2005) Evidenzbasierte Hygienemaßnahmen mittels spa-Typisierung bei MRSA-Haufungen im Krankenhaus. *Dtsch Med Wochenschr* 130: 1364-1368.
- (30) Mellmann A, Friedrich AW, Rosenkötter N, Rothgänger J, Karch H, Reintjes R, Harmsen D (2006) Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks. *PLoS Med* 3: e33.
- (31) Melzer M, Eykyn SJ, Gransden WR, Chinn S (2003) Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than methicillin-susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of British patients with nosocomial infection and bacteremia. *Clin Infect Dis* 37: 1453-1460.
- (32) Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S (1991) Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29: 2240-2244.



- (33) Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis NJ, van Leuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Coombes G, Cookson B (2003) Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J Clin Microbiol 41: 1574-1585.
- (34) Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K (2002) Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiol 40: 4289-4294.
- (35) Perry JD, Davies A, Butterworth LA, Hopley ALJ, Nicholson A, Gould FK (2004) Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 42: 4519-4523.
- (36) Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, Mourouga P, Sauvan V, Touveneau S, Perneger TV (2000) Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. Infection Control Programme. Lancet 356: 1307-1312.
- (37) Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N (2000) Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. J Clin Microbiol 38: 2429-2433.

- (38) Robinson DA, Enright MC (2003) Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3926-3934.
- (39) Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A (1999) The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg Infect Dis* 5: 9-17.
- (40) Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bachi B (1992) Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 25-31.
- (41) Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
- (42) Tan TY, Corden S, Barnes R, Cookson B (2001) Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures by real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 39: 4529-4531.
- (43) Tiemersma EW, Bronzwaer SLAM, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H (2004) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis* 10: 1627-1634.
- (44) Towner KJ, Talbot DC, Curran R, Webster CA, Humphreys H (1998) Development and evaluation of a PCR-based immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 47: 607-613.

- (45) Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellering RC, Ferraro MJ (2001) Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 358: 207-208.
- (46) Uehara Y, Nakama H, Agematsu K, Uchida M, Kawakami Y, Abdul Fattah AS, Maruchi N (2000) Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium* sp. *J Hosp Infect* 44: 127-133.
- (47) Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy M, Etienne J (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9: 978-984.
- (48) Wertheim HFL, Vos MC, Boelens HAM, Voss A, Vandembroucke-Grauls CMJE, Meester MHM, Kluytmans JAJW, van Keulen PHJ, Verbrugh HA (2004) Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use. *J Hosp Infect* 56: 321-325.
- (49) Wielders CL, Vriens MR, Brisse S, de Graaf-Miltenburg LA, Troelstra A, Fleer A, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC (2001) In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. *Lancet* 357: 1674-1675.
- (50) van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM (1993) Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31: 406-409.

(51) von Eiff C, Becker K, Hasenberg F, Anders A, Peters G, Gatermann SG, PEG Study Group (2005). Hospital- and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): First results of a German multicenter study. DGHM, Göttingen. 25.-29.9.2005.

(52) von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. N Engl J Med 344: 11-16.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
cMRSA	„community-acquired“ MRSA (syn. CA-MRSA)
KBE	Kolonie-bildende Einheit
<i>mecA</i>	Gen, kodiert für die Methicillinresistenz
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus epidermidis</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSE	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>nuc</i>	Gen, kodiert für eine <i>S. aureus</i> -spezifische Nuklease
<i>orfX</i>	Gen im Übergangsbereich zwischen der SCCmec-Kassette und dem <i>S. aureus</i> Genom
SCCmec	Resistenzgenkassette in <i>S. aureus</i> , die das <i>mecA</i> Gen beinhaltet
Spa	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A
<i>spa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A Gen



## Danksagung

Ich möchte mich allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben:

Herrn Prof. Dr. rer.nat. H. Karch danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung, alle experimentellen Arbeiten am Institut für Hygiene durchführen zu können.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A.W. Friedrich danke ich für die Betreuung der Arbeit. Mit lebhaften Diskussionen unterstützte er mich bei der Durchführung der Laborarbeiten und half mir besonders bei allen organisatorischen Problemen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung Krankenhaushygiene am Institut für Hygiene für die vielfältige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau E. Richter und Frau U. Keckevoet, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mir viele praktische Tipps gaben. Ohne sie wäre die praktische Durchführung meiner Experimente nicht in diesem Umfang möglich gewesen.

Schließlich danke ich Herrn Dr. med. A. Mellmann, der mir bei der Niederschrift helfend zur Seite stand und die Arbeit immer wieder kritisch durchgesehen hat.