

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Peters -

Evaluation von Screeningverfahren zum Schnelldachweis von Methicillin-resistenten
Staphylococcus aureus (MRSA)-Isolaten: Vergleich der Testsysteme BacLite Rapid
MRSA+ und BD GeneOhm MRSA

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Maas, Dominik

aus Coesfeld

2015

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Becker

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. A. Mellmann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.01.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Peters -

Referent: Prof. Dr. K. Becker

Koreferent: PD Dr. A. Mellmann

Zusammenfassung

Evaluation von Screeningverfahren zum Schnellaufweis von Methicillin-resistenten
Staphylococcus aureus (MRSA)-Isolaten: Vergleich der Testsysteme BacLite Rapid
MRSA+ und BD GeneOhm MRSA

Maas, Dominik

Infektionen durch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Isolate sind ein weltweites Problem in allen medizinischen Bereichen. Eine schnelle Erkennung und Isolierung eines MRSA-Trägers ist Voraussetzung, um eine Übertragung auf andere Patienten und medizinisches Personal zu vermeiden. Die kulturelle Anlage von Screeningmaterialien als Goldstandard ist mit einer ca. 24-48-stündigen Kultivierung und anschließender Identifizierung und Empfindlichkeitstestung zu langsam, um rasch effiziente Maßnahmen zur Vorbeugung einer Übertragung von MRSA einzuleiten. Neue Schnellverfahren, die noch am Tag der Probenentnahme Ergebnisse liefern können wurden zu diesem Zweck markteingeführt. Zwei Schnellverfahren mit unterschiedlichem methodischem Ansatz wurden in dieser Studie evaluiert. Als Referenzmethode diente das klassische Kulturverfahren. Das auf Kurzkultur basierende Testsystem BacLite Rapid[®] MRSA⁺, dessen Ergebnisse nach ca. 5 h zu Verfügung standen und das auf molekulargenetischem Nachweis basierende BD GeneOhm[™] MRSA-Testsystem, welches Ergebnisse nach ca. 2 h lieferte. Von 497 getesteten Patienten wurden klassisch kulturell bei insgesamt fünf Patienten eine MRSA Besiedlung entdeckt. Das BacLite Rapid MRSA⁺ konnte davon zwei MRSA-Träger erkennen und zeigte eine Spezifität von 98,4 %, eine Sensitivität von 40,0 % und einen positiven Vorhersagewert von 20,0 % und einen negativen Vorhersagewert von 99,4 %. Das BD GeneOhm[™] MRSA-Testsystem konnte alle MRSA-Träger identifizieren und zeigte eine Spezifität von 99,0 %, eine Sensitivität von 100,0 % sowie positive und negative Vorhersagewerte von 50,0 % bzw. 100,0 %. MRSA-Schnelltestverfahren können einen deutlichen Zeitgewinn gegenüber konventionellen Kulturverfahren erzielen, diese jedoch nicht ersetzen.

Tag der mündlichen Prüfung

06.01.2015

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Evaluation von Screeningverfahren zum Schnellaufweis von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Isolaten: Vergleich der Testsysteme BacLite Rapid MRSA+ und BD GeneOhm MRSA

im Institut: für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsklinik Münster

unter der Anleitung von: Prof. Dr. med. Karsten Becker

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Lüdinghausen, den 08.01.2015

Dominik Maas

1 EINLEITUNG	1
1.1 METHICILLIN-RESISTENTER <i>STAPHYLOCCOCUS AUREUS</i>	2
1.1.1 ANTIBIOTIKATHERAPIE	3
1.1.2 VORKOMMEN UND EINTEILUNG VON MRSA	5
1.1.3 BEKÄMPFUNG VON MRSA	8
1.2 MOLEKULARE NACHWEISVERFAHREN VON MRSA	10
1.2.1 BD GENE OHM MRSA	12
1.2.2 ANALYSEVERFAHREN DES BACLITE RAPID® MRSA+	13
1.3 AUFBAU DER STUDIE	16
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 MATERIALIEN	17
2.1.1 LABOREINRICHTUNGEN UND GERÄTE	17
2.1.2 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	17
2.1.3 GEBRAUCHTSLÖSUNGEN	18
2.1.4 SOFTWARE	18
2.2 METHODEN	19
2.2.1 PATIENTENPROBEN	19
2.2.2 AUSSCHLUSSKRITERIUM VON PATIENTEN	19
2.2.3 RANDOMISIERUNG	19
2.2.4 BEDIENUNG DES BACLITE RAPID® MRSA+	20
2.2.5 VORBEREITUNG DES BACLITE® READER	20
2.2.6 VORBEREITUNG DES BACLITE® PROBEN-PROZESSOR	21
2.2.7 ANALYSEVERFAHREN DER PATIENTENPROBEN	21
2.2.9 BD GENE OHM™ MRSA-TEST	23
2.2.10 BD GENE OHM™ MRSA-TESTVORGANG	23
2.2.11 KULTURBASIERTE ANALYSEN	24
2.2.13 DEFINITION VON FALSCH-POSITIV UND FALSCH-NEGATIV ERGEBNISSEN	24

3 ERGEBNISSE	25
4 DISKUSSION	30
4.1 VERGLEICH BD GENE OHM MRSA MIT BACLITE RAPID MRSA+	32
4.3 AUSBLICK	36
5 LITERATURVERZEICHNIS	37
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	52
7 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	54
8 DANKSAGUNG	55
9 LEBENSLAUF	56
ANHANG	I
AUFTEILUNG DER KONS-STÄMME IN DIESER STUDIE	II

1 Einleitung

Das Bakterium *Staphylococcus aureus* besitzt eine Kugelform, ist 1 μm im Durchmesser und bildet haufen- oder traubenartige Ansammlungen. Auf Agarplatten wachsen nach 24 h Bebrütung runde, leicht erhabene Kolonien, die meist ein goldgelb-farbenes Pigment produzieren und zur α -Hämolysen fähig sind. Abweichend davon wachsen einige Isolate langsamer und bilden kleinere Kolonien aus, den sogenannten „small colony variant“-Phänotyp der an einen intrazellulären Lifestyle angepasst ist und abweichende Charakteristika besitzt [6, 56, 61, 77, 93, 97]. *S. aureus* ist fakultativ anaerob, Gram- und Katalase-positiv, welches zu Diagnostik ausgenutzt werden kann [54, 64, 90].

Unter den Gram-positiven Kommensalen ist *S. aureus* der häufigste pyogene Infektionserreger und Verursacher einer Bandbreite von Erkrankungen wie z.B. lokale eitrige Infektionen der Haut, Wundinfektionen und der Weichgewebe (Furunkel/Karbunkel, Pneumonie, Phlegmone, bullöse Impetigo) sowie toxinbedingte Krankheiten (Lebensmittelintoxikation, Dermatitis exfoliativa, Toxic-Shock-Syndrome) und invasive Infektionen (Sepsis, Endocarditis) [4, 5, 64].

Diese Erkrankungen werden immer schwieriger zu therapieren, da die Anzahl der Antibiotika-resistenten Stämme weltweit zu nehmen. Gleichzeitig nahm die Entwicklung neuer Antibiotika in den letzten Jahrzehnten ab. Dies schränkt die Therapiemöglichkeiten von multiresistenten Bakterienstämmen stark ein. Bei *S. aureus* konnte schon ein Jahr nach Einführung, 1960, eine Resistenz gegenüber Methicillin beschrieben werden, 2002 trat die erste Vancomycin-Resistenz in den USA nachweislich auf [14, 52]. Methicillin wurde für die aufgetretenen, Penicillin-resistenten *Staphylococcus* spp. eingesetzt. Penicillinasen, die von den Bakterien produziert wurden, verhinderten den therapeutischen Effekt auf die Bakterien und machten neue Antibiotika nötig. Die Resistenz gegen Methicillin, als historisch eingesetzter Substanz, ist bei Staphylokokken zum Synonym für die Resistenz gegenüber allen β -

Lactam-Antibiotika geworden (Ausnahme: neue, sog. MRSA-wirksame Cephalosporine). Daher werden sie als Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) bezeichnet.[107] Eine schnelle Identifizierung von MRSA-Keimträgern ist in Anbetracht der schweren Erkrankungen ein wichtiger Beitrag, um eine Übertragung auf gefährdete Patienten zu vermeiden. Seit einigen Jahren ist dies mittels Schnelltestverfahren möglich. Eine Vielzahl der Tests basiert auf dem molekularem Nachweis von Abschnitten im *S. aureus*-Genom, die für die Antibiotikaresistenz verantwortlich sind [74, 111]. Dabei wird zwischen Multiple loci-PCR und Single locus-PCR unterschieden. Einen neuen Ansatz bietet das BacLite Rapid[®] MRSA⁺, welches mittels kulturellem Verfahren die Methicillin-Resistenz bei *S. aureus* in Nasenproben nachweisen soll.

1.1 Methicillin-restistenter *Staphylococcus aureus*

Die Fähigkeit, gegenüber β -Lactam-Antibiotika resistent zu sein, wird auf dem *mecA* Genabschnitt kodiert. Dies ist für die Produktion von einem zusätzlichen Penicillin-Binding-Protein verantwortlich, dem modified penicillin-binding protein 2a (PBP 2a). Das *mecA* Gen ist Bestandteil einer Genstruktur, die in Methicillin-sensibler *S. aureus* nicht vorhanden ist, der staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), welche 1975 zuerst von Kuhl et al. entdeckt wurde [62, 89]. 2012 wurde ein *mecA*-Gen-Homolog, *mecA*_{LGA251} bzw. *mecC* entdeckt, das auch zur Betalaktam-Resistenz führt [32].

Elf verschiedene Gruppen von SCC*mec* sind bisher bekannt, wobei die Einteilung nach *ccr* Genabschnitt und *mecA* Genabschnitt erfolgt [46, 48] s. Abb.1. Noch ist nicht genau gesichert, woher *S. aureus* diesen Genabschnitt erlangt hat, vermutet werden Spezies der Gattung *Micrococcus* [2]. Es wird ein horizontaler Gentransfer zwischen Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) und einem Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylococcus angenommen [39, 40, 100]. Dies ist nicht die einzige Resistenz die MRSA-Isolate besitzen können. Bei vielen *Staphylococcus*-Arten sind Penicillinasen (Betalaktamasen) nachgewiesen worden, die Penicilline

aufspalten und so für das Bakterium unwirksam machen. Bei vielen Stämmen können noch andere Resistenzmechanismen beobachtet werden. So besitzen viele Isolate Resistenzen gegenüber Aminoglycoside, Fluoroquinolone und Makrolide [66].

1.1.1 Antibiotikatherapie

Obwohl die Therapieoptionen limitiert sind, gibt es noch einige Antibiotika, die sich als effektiv für die Behandlung von MRSA zeigen. Vancomycin wurde 1956 in Bodenproben mit *Streptococcus orientalis* gefunden. Da zu diesem Zeitpunkt schon viele *S. aureus* Stämme gegen Penicillin durch Penicillinasen resistent waren, wurde dieses Antibiotikum schon zwei Jahre nach seiner Entdeckung innerhalb der USA eingesetzt. Die ersten Präparate hatten jedoch eine sehr hohe Toxizität, so dass sie nur in seltenen Fällen in den Kliniken angewandt wurden. Erst in den 1970iger Jahren wurde Vancomycin wieder vermehrt eingesetzt, da MRSA zunehmend ein akutes Problem innerhalb der hospitalisierten Patienten-Gruppe wurde.

Die bakterizide Wirkung von Vancomycin gegen Gram-positive Keime beruht auf einer Bindung an das endständige D-Alanyl-D-Alanin des UDP-Muramylpentapeptids, welches zum einen die Elongation der Peptidoglykankette verhindert und zum anderen die Quervernetzung. Vancomycin wird dazu nicht in das Bakterium geschleust, sondern bindet sich an der äußeren Zellwand an das Pentapeptid. Durch seine schlechte Gewebspenetration eignet sich Vancomycin nicht besonders gut bei Pneumonien. Seit einigen Jahren gibt es jedoch auch MRSA-Stämme, die gegen Vancomycin resistent geworden sind (VRSA MIC $\geq 16\mu\text{g/ml}$). Dies beruht auf einen neuen Genabschnitt dem *vanA*-Cluster, welcher in *Enterococcus sp.* gefunden und auf *Staphylococcus* übertragen wurde. Noch nicht geklärt ist die Entstehung von VISA (MIC 4-8 $\mu\text{g/ml}$) dem Vancomycin intermediate *S. aureus*, welche auf eine Verdickung der Zellwand zu beruhen scheint. [14, 16, 67, 79, 109].

Linezolid ist das erste Antibiotikum einer neuen Klasse den Oxazolidinonen. Es bindet sich an die 50S Untereinheit des bakteriischen Ribosomenkomplex, wodurch es die Formation eines funktionsfähigen Ribosomen verhindert. Besonders gut wirkt Linezolid gegen Gram-positive Erreger, so auch gegen MRSA. Eine viel zitierte Besonderheit ist seine 100 % Bioverfügbarkeit bei oraler Medikation. Insgesamt zeigt es eine sehr gute Gewebspenetration. Damit ist es besonders als Therapie von Pneumonien geeignet [38].

Ein weiteres neuartiges Antibiotikum der Lipoproteine ist Daptomycin, welches erst 2007 in Deutschland eingeführt wurde und in Proben von *Streptomyces roseosporus* entdeckt wurde. Sein Wirkungsmechanismus beruht auf einer Calcium gesteuerten Membranporenbildung, die Kaliumionen aus dem Bakterium heraus strömen lassen. Dies führt zu einer Zelldepolarisierung und damit zum Zelltod ohne eine Lyse zu provozieren. Da es mit dem Surfactant der Lungenalveolaren interagiert, eignet es sich jedoch nicht bei einer Therapie von Pneumonien mit MRSA [17, 87]. Auch wurden bereits Resistenzen gegenüber Daptomycin beobachtet, wobei die Verdickung der Bakterienwand eine größere Rolle zu spielen scheint. Trotz Resistenz wurde eine abnehmende Virulenz der Erreger beobachtet [86].

Ein weiteres Antibiotikum der neuen Klasse der Glycylzykline ist Tigecyclin. Die Wirkungsweise beruht auf einer Interaktion mit dem bakteriellen Ribosomen, dies macht es bakterizid. Das weite Spektrum bezieht Gram-positive sowie Gram-negative Bakterien ein. Bei Patienten mit Leberschäden muss die Dosis angepasst werden, bei Nierenschäden ist dies nicht notwendig [78].

1.1.2 Vorkommen und Einteilung von MRSA

Die Nasenvorhöfe und der Rachen sind die typischsten Stellen für eine persistente Keimbesiedlung, obwohl auch alle anderen Hautoberflächen kurzzeitig besiedelt werden können [5]. Zwei verschiedene Typen von *S. aureus* Trägern konnten identifiziert werden: die ständige Besiedlung (persistent carriage) und die intermittierende

Besiedlung (intermittent carriage) [70, 95, 104, 105]. In 20 % der Bevölkerung kann eine ständige Besiedlung mit einem eigenständigen Keim nachgewiesen werden und in 30 % eine intermittierende Trägerschaft, 50 % sind keine Keimträger [104]. Eine ständige Besiedlung birgt ein größeres Risiko eine Infektion mit *S. aureus*, mit den oben genannten Krankheitsbildern zu erlangen, da die Stämme der Nasenvorhöfe mit denen in Blutkulturen bei Bakteriämien identisch waren [98].

Bei Patienten, die mit einem Methicillin-resistenten *S. aureus* infiziert waren, konnten eine längere Aufenthaltsdauer, höhere Sterberaten und höhere Therapiekosten nachgewiesen werden [15, 79]. Dieses Problem verschärft sich durch steigende MRSA-Raten innerhalb solcher Bevölkerungsanteile, die nicht die typischen Risikofaktoren für nosokomial erworbene MRSA (health care-associated MRSA; HA-MRSA) aufweisen, den so genannten community-acquired MRSA (CA-MRSA) [58, 110]. So kommen Patienten nicht mehr allein im Krankenhaus mit diesen resistenten Stämmen in Kontakt, viel mehr gibt es nun MRSA-Stämme, die sich außerhalb von Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen durchgesetzt haben und ein ständiges Reservoir für MRSA-Infektionen bilden [13]. Diese MRSA-Stämme bilden eine völlig neue, auch durch unterschiedliche Selektionsdrücke, genetisch differenzierte Gruppe. Auffällig wird dies bei den *SCCmec*-Abschnitten. So kommen Typ I-III nur in HA-MRSA vor, Typ IV in beiden MRSA-Entitäten und Typ V nur in CA-MRSA [37, 73, 109].

CA-MRSA-Stämmen sind typischerweise durch den Besitz des Panton-Valentine Leukocidins (PVL) charakterisiert. PVL wird häufiger in CA-MRSA gefunden, dabei muss davon ausgegangen werden, dass es nicht einen weltweiten Klon als Ursprung gibt, vielmehr scheinen verschiedene CA-MRSA Stämme auf der Welt das PVL-Gen in ihre *SCCmec* eingeschlossen zu haben [24, 96]: „PVL ist ein porenbildendes Toxin, das spezifisch an die Zellwand von polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen bindet und deren Zelltod verursacht.“ [55].

Dieser MRSA-Stamm wird mit nekrotisierenden Hautinfektionen und schweren Pneumonien in Verbindung gebracht. Besonders bei engem Hautkontakt, etwa unter

Kleinkindern oder bei Sportlern, wird dieser Keim leicht übertragen. Die Hautläsion mit zentraler Nekrose ähnelt in manchen Regionen einem Biss der Spinnenart *Loxosceles reclusa*, die hauptsächlich in Mittelamerika vorkommt und dort zu Verwechslungen führen kann. In Europa ist diese Spinnenart nicht heimisch. [12].

Auch Tiere wie Schweine, Hunde und Pferde können von MRSA besiedelt sein und diese auf den Menschen übertragen. Dies bildet die dritte Gruppe der MRSA Einteilung, die als „livestock-associated“ LA-MRSA bezeichnet wird [44, 94]. Dabei wird beobachtet, dass häufig nicht die Tiere unter einer akuten Infektion leiden, jedoch der Tierhalter eine MRSA - Infektion entwickelt. Vergleicht man diese MRSA, so zeigt sich eine Häufung von wenigen Typen, die international als LA-MRSA klassifiziert werden können [44, 58, 68, 94, 106].

Die Übertragungsmöglichkeiten sind also vielfältig. Es lässt sich sagen, dass sie hauptsächlich über direktem Kontakt mit infizierten Oberflächen oder beim direkten Personenkontakt erfolgt. Dies ist besonders im Gesundheitssektor ein sensibles Problem, da Pfleger und Ärzte in ständigem Kontakt mit ihrem Patienten stehen. Hier könnten neben dem Patientenkontakt auch Kleidungsstücke wie langärmlige Kittel, Stethoskope oder Computer-Tastaturen potentielle Vektoren für MRSA Infektionen sein [26, 84, 92].

Folgende Risikofaktoren konnten für die HA-MRSA-Trägerschaft eruiert werden: bekannte MRSA-Anamnese, vorhergegangene Krankenhausaufenthalte, direkten Kontakt zu Tieren der landwirtschaftlichen Tiermast insb. Schweine, Patienten aus Regionen / Einrichtungen mit bekannter hoher MRSA-Prävalenz, Kontakt zu MRSA-Patienten während eines stationären Aufenthaltes.

Zusätzlich bei Kombination von zwei oder mehr der folgenden Risikofaktoren: antibiotische Therapien in den letzten 6 Monaten, chronische Pflegebedürftigkeit, liegende Katheter, Dialyse, chronische Wunden und Brandverletzungen [75, 80, 83].

Die empfohlene Krankenhauspraxis sieht die Kontaktisolation des Patienten und eine Eradikation des MRSA-Keims mit Mupirocin vor [59]. Desinfektion der Hände nach

Patientenkontakt und frühe Isolierung von MRSA-Patienten sind in der täglichen Praxis sinnvoll [51].

1.1.3 Bekämpfung von MRSA

MRSA besiedelte Patienten werden isoliert und mittels Mupirocin, eine antibiotische Nasensalbe behandelt. Zudem werden aseptische Shampoos und Seifen benutzt, in manchen Fällen scheint eine zusätzliche systemische Therapie mit einem resistenzgerechtem Antibiotikum wirkungsvoll zu sein. Erst wenn drei aufeinander folgende Abstrichuntersuchungen negativ auf MRSA getestet wurden, kann eine Eradikation als erfolgreich angenommen werden [33, 55]. Es sollte nach Ablauf einiger Wochen eine weitere Untersuchung erfolgen, um ein langfristigen Therapieerfolg zu kontrollieren.

Dieses Management zeigt eine effektive Strategie, um die Keimbesiedlung zu beseitigen. Durch steigende MRSA Patientenfälle, steigt auch die Behandlung mit Mupirocin und damit die Resistenzbildungen [42]. Der *ileS* Genabschnitt kodiert eine niedrige Resistenz mit MHK-Werten von 8-256 $\mu\text{g/ml}$, während das *mupA* Gen eine high-level-Resistenz mit MHK-Werten über $\geq 512 \mu\text{g/ml}$ bedingt [45, 63, 76, 88, 109]. Weitere Ausbreitung dieser Resistenzen sind durch eine nicht ausreichende ambulante Weiterbehandlung oder durch ungenügende Therapieüberprüfung bei Wiederaufnahme erklärbar. Dies ist ein großes Problem bei der Behandlung jedes multiresistenten Keims und sollte hohe Aufmerksamkeit geschuldet werden [9].

Von starkem Interesse ist die *in vivo* nachgewiesene mögliche Übertragung von Mupirocin-Resistenz vermittelnden Gen-Abschnitten, das *mupA*, von *S.epidermidis* auf MRSA [45]. Da die Therapieoptionen für eine Infektion mit MRSA begrenzt sind und durch neue Resistenzen gefährdet werden, sollten die gängigen Verfahrensweisen kritisch hinterfragt und verbessert werden. Eine wirksame Vorbeugung von neuen Resistenzen sowie das Vermeiden einer Übertragung auf andere Patienten ist der

einzig nachhaltiger Umgang mit MRSA. Dieses Verfahren wird in der niederländischen Search and Destroy-Police angewandt. Sowohl der Patient als auch das Krankenhauspersonal wird mit Abstrichen auf eine Kolonisierung mit MRSA untersucht. Dabei werden in den Niederlanden die Patienten in eine Hoch- und Niedrigrisiko-Gruppe unterteilt. Zu der Hochrisiko-Gruppe gehören Patienten, die kein zusätzliches Risiko aufweisen, jedoch einen 24stündigen Aufenthalt in einem fremden Krankenhaus innerhalb der letzten 6 Monate hatten, und Patienten, die in ihrer Krankengeschichte bereits einmal ein MRSA positives Testergebnis hatten zusätzlich zu den sonst bekannten Risikofaktoren für eine MRSA-Kolonisierung [71].

Die Hochrisiko-Gruppe wird bis zum Testergebnis präventiv isoliert und erst nach negativem Testergebnis endisoliert. Alle anderen Patienten werden nicht präventiv isoliert, erst bei positivem Testergebnis wird dieser Patient isoliert und eine Eradikation des Keims durchgeführt. Die Pflegekräfte, die in Kontakt mit dem positiv getesteten Patienten waren, werden dann auch auf eine MRSA Besiedlung getestet und falls nötig vom Dienst ausgeschlossen bis der Keim eradiziert wurde. Ergänzt wird dies durch einen engen Informationsaustausch zwischen den Krankenhäusern und den Gesundheitsinstituten und einer konsequenten Hand- und Oberflächendesinfektion. Dies zeichnet sich als ein sehr kostenintensives Verfahren aus, wenn die Patientenkohorte eine hohe Prävalenz mit MRSA hat. Eine stationäre Sanierung kostet im Schnitt 8000-9000 €, dies kommt durch den zusätzlichen Pflegeaufwand und die Kosten durch die Isolierung zustande [30, 41, 79]. Aus diesem Grund ist es wichtig, die MRSA-Rate so niedrig wie möglich zu halten. Dennoch zeigt sich dieses Verfahren als kosteneffektiv, selbst wenn die Prävalenzrate für MRSA-Infektionen auf über 8 % ansteigt [36, 71]. Dies erklärt sich dadurch, dass im Anfangsstadium durch gutes Screening die MRSA-Besiedlungen aufgedeckt und eradiziert werden können. Die Prävalenzrate kann somit gesenkt werden. Im Umkehrschluss werden MRSA-Infektionen vermieden, die deutlich höhere Kosten verursachen und eine erhebliche Gefahr für hospitalisierte Patienten bedeuten. Genau dies zeigt ein aktuelles Projekt der EUREGIO Münsterland das MRSA-net [31, 81]. Zusätzlich ist seit Juli 2009 eine

nachgewiesene MRSA-Infektion im Blut oder im Liquor durch den Gesetzgeber meldepflichtig [82].

1.2 Molekulare Nachweisverfahren von MRSA

Zur Identifizierung von MRSA-kolonisierten Patienten wurden verschiedene Testverfahren entwickelt. Die klassischen Verfahren basieren auf einer kulturellen Anzucht der Erreger auf nichtselektiven Medien (z.B. Blutagar) oder – nachfolgend entwickelt – auf Selektiv-Medien. Zur Sensitivitätssteigerung ist eine 24 h Anreicherung in einer Flüssigbouillon mit anschließendem Beimpfen der festen Nährmedien ratsam. Die Bebrütung der festen Nährmedien benötigt erneut 24 h gefolgt von einer Kontrollablesung nach 48 h. Eine früheste Aussage konnte so erst nach zwei bzw. drei Tagen erfolgen.

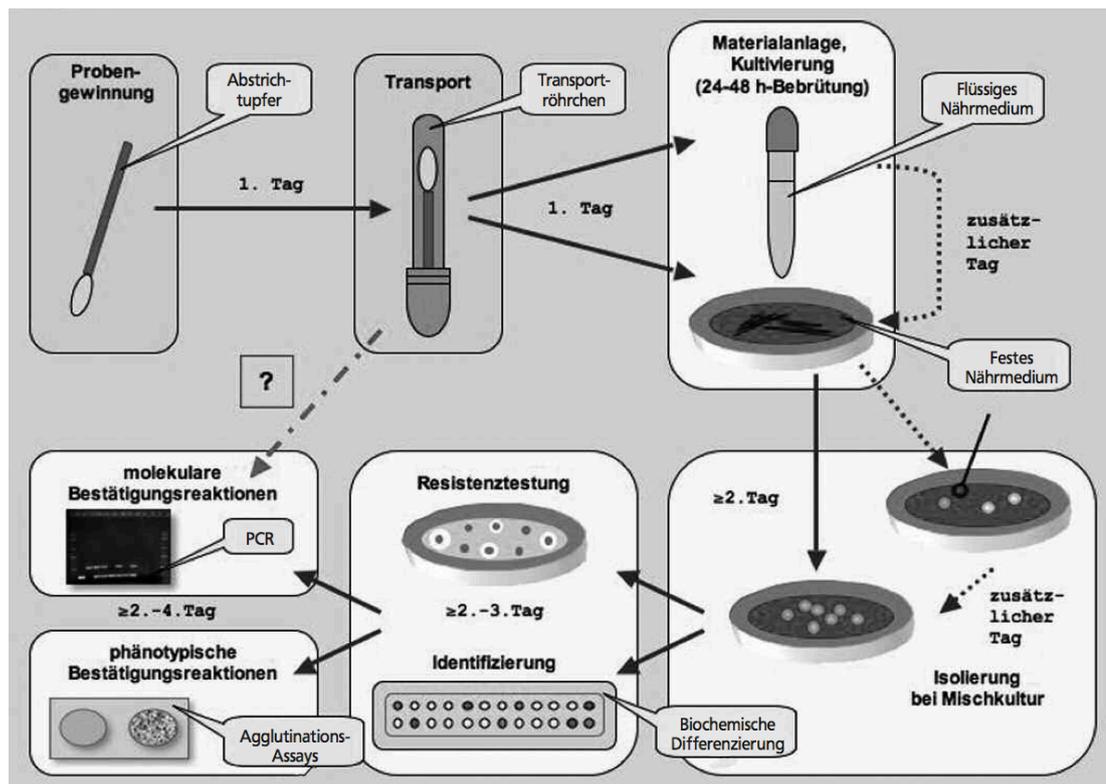


Abbildung 2 Kultureller Nachweis von MRSA [3]

Um eine schnelle und damit effektive Isolierung eines MRSA-Trägers zu gewährleisten wurden Testsysteme auf molekularer Basis entwickelt. Dazu wird die Polymerase-Chain-Reaction verwendet. Bei einer PCR werden spezifische Genabschnitte mittels Genbarken so genannten Primern verwendet, die sich an die vorgesehenen Bereiche der DNA anlagern und diese Abschnitte vervielfältigen. Die Primer bestehen aus Oligonukleotide, welche eine Nukleotidabfolge von ca. 20-30 Basenpaaren haben und sich komplementär an den gewünschten Stellen anlagern. Durch freie Nukleotide (ATP, TTP, GTP und CTP) wird mittels einer Polymerase die DNA-Abschnitte zwischen den Primern kopiert. Die DNA wird dazu zuerst auf 95°C erhitzt, damit sich die Doppelstränge auflösen und die Primer in einem anschließendem Kühlschritt von 50-60°C die Chance haben sich an die freien Stellen anzulagern. Bei Anlagerung kann nun der gewünschte Bereich mittels der Polymerase vervielfältigt werden. Dieser Schritt wird bei einer PCR mehrfach wiederholt.

Grundsätzlich kann bei der MRSA-Diagnostik zwischen Multi-loci- und Single-locus-PCR unterschieden werden. Bei der Multi-loci-PCR werden verschiedene Genabschnitte unabhängig von einander vervielfältigt. So kann das Vorhandensein des *mecA* Gens direkt nachgewiesen werden. Zusätzlich mit einem für *S.aureus* spezifischen Bereich ist so ein möglicher MRSA-Befall detektiert. Dies funktioniert aber nur, wenn im Probenmaterial keine Methicilin-resistente-Koagulase-negativen Staphylococcen befinden, die auch das *mecA* Gen tragen. Da bei der Multi-loci-PCR nicht sicher nachgewiesen wird, aus welchem Erreger dieses Gen stammt. So würde nur ein MRSA Befall vorgetäuscht, wenn MSSA und MR-KoNS in einer Patientenprobe gleichzeitig vorlägen. Um dies zu vermeiden wurde die Single-locus-PCR eingesetzt. Bei dieser MRSA-Diagnostik wird nicht mehr direkt das *mecA* Gen nachgewiesen, sondern es wird lediglich das Vorhandensein der *SCCmec* und ein Staphylococcus-spezifische *orfX*-Genbereich zusammenhängend nachgewiesen. So kann sicher ein *S.aureus* selektiv mit positiver *SCCmec* in seinem Genom erkannt werden. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass es Genmutationen gibt, sogenannte „Dop outs“, bei der das *mecA* Gen nicht in der *SCCmec* Kassette eingebettet ist. Dies führt zur

falsch positiven Testergebnissen. Zusätzlich müssen für verschiedene *SCCmec*, verschiedene Target Primer erstellt werden.

1.2.1 BD GeneOhm MRSA

Das BD GeneOhm MRSA basiert auf der Single-locus-PCR im Multiplex-RealTime-Verfahren. Bei der RealTime-PCR werden die Primer mittels fluoreszierender Farbstoffe markiert, so dass eine vorher definierte Lichtwellenlänge bei erfolgreicher Vervielfältigung detektiert werden kann. Dies ermöglicht eine Aussage über die Menge des vermehrten DNA Abschnitts in jedem Zyklus. Der Zyklus welcher ein positives Signal ausgibt, wird auch crossing point genannt. Der crossing point wird früher erreicht, je mehr Ausgangs-DNA vorliegt. Durch dieses Vorgehen kann ein positives Ergebnis früher erreicht werden und so eine Testaussage beschleunigt werden.

Werden mehrere, unterschiedliche Primerpaare in einer PCR Reaktion benutzt nennt man dies Multiplex-PCR. Dabei werden für die Primer jeweils unterschiedliche Wellenlängen benutzt, damit eine Unterscheidung der jeweiligen DNA-Abschnitt erfolgen kann. Ein Problem dieses Verfahrens ist, dass alle Reaktionen um Nucleotide und Polymeraseaktivität konkurrieren.

Zusätzlich kann die Polymeraseaktivität durch Verunreinigungen des Ausgangsmaterials gehemmt sein. Um dies zu relativieren wird eine interne Kontrolle mittels künstlichem DNA-Abschnitt durchgeführt. Ein falsch negatives Ergebnis soll so vermieden werden. Auch hierbei gilt es zu beachten, dass eine Interaktion zwischen interner Kontrolle und gewünschter Amplifikation möglich ist.

Notwendig wird die Multiplex-PCR in der MRSA-Diagnostik auf Grund der verschiedenen *SCCmec*-Arten, die alle das *mecA* Gen in sich tragen. Im verwendeten Verfahren von BD wird das *mecA* Gen nicht direkt nachgewiesen. Die Lage des Gen innerhalb der *SCCmec* zu einem *S. aureus* spezifischen Genbereich, wie im *orfX*

Gen, ist zu weit entfernt, um es im Single-locus durchzuführen. Daher wird nur ein Teilbereich des *SCCmec* und dem angrenzenden *orfX* Gen amplifiziert.

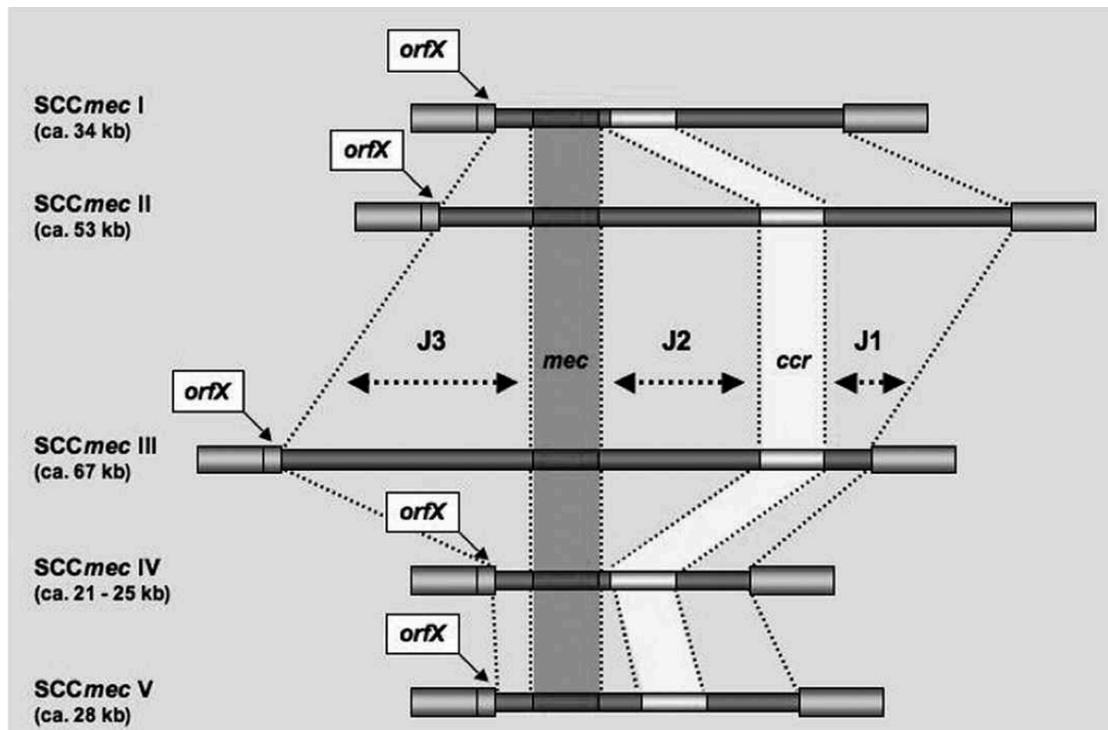
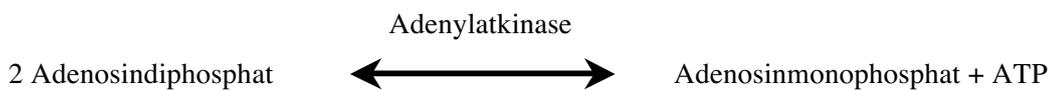


Abbildung 3 Vereinfachtes Schema des Aufbaus von SCCmec [3]

1.2.2 Analyseverfahren des BacLite Rapid[®] MRSA⁺

Das BACLITE Rapid MRSA+ basiert auf dem Verfahren der Biolumineszenz mittels Adenylatkinase Reaktion.



Firefly-Luciferase-Reaktion:



Der kulturelle Nachweis wird über eine Inkubation der Abstrichtupfer von insgesamt 4h erreicht. Dazu wird nach bereits 2h Bebrütung in einem Selektivmedium mit Cefoxitin und Colistin eine erste Testung durchgeführt. Dies nutzt das System um einen Wachstumsvergleich nach weiteren 2h zu erhalten. Nimmt die Biolumineszenz zu, wird von einem Wachstum von Methicillin-resistenten Bakterien ausgegangen.

Die Menge des ausgesendeten Lichtes ist proportional zu der Anwesenheit von Adenylatkinase und ATP. Da andere Bakterien durch die Antibiotika gehemmt werden, muss bei einer gesteigerten Lichtausstrahlung in der zweiten Lesung davon ausgegangen werden, dass ein Bakterienwachstum trotz Antibiotika stattgefunden hat. Da durch die Waschschrte im BacLite® Proben-Prozessor selektiv *S. aureus* in der Probe belassen wurde und mittels Lysostaphin denaturiert wurde, wird davon ausgegangen, dass Methicillin-resistenten *S. aureus* die Ursache der verstärkten Lichtreaktion ist. Dies wurde automatisch durch die Software ermittelt und mit den Kontrollgruppen der Positiv- und Negativ-Gruppe verglichen.

Testverfahren

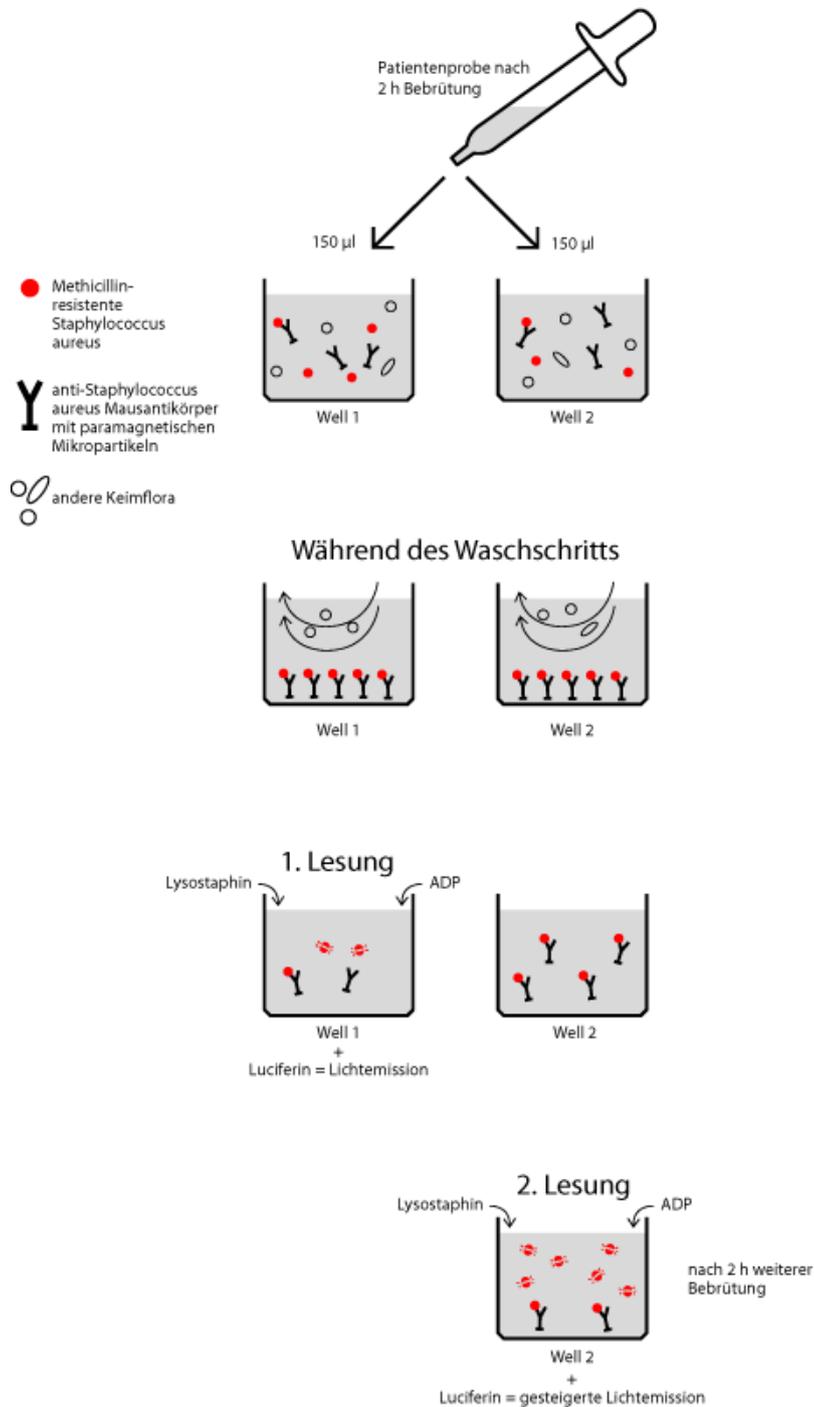


Abbildung 4 BacLite Rapid MRSA Testverfahren

1.3 Aufbau der Studie

Zum Screening auf eine Besiedlung mit MRSA wurden Nasenabstriche von 497 Patienten aus der Poliklinik und Klinik der Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikum Münster untersucht. Die Patientenproben wurden durch das geschulte Pflegepersonal abgenommen und bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert. Am folgenden Tag wurden die Proben durch die beiden Diagnoseverfahren BD GeneOhm™ MRSA und das BacLite Rapid® MRSA⁺ analysiert. Gleichzeitig wurde eine Vergleichskultur angelegt. Ein Abstrich wurde direkt auf Columbia-Agar Platten ausgestrichen und danach in einer mit Dextrose angereicherten Nährlösung für 24 h bebrütet und erneut ausgestrichen. Die gewachsenen Kulturen wurden dann morphologisch und durch Schnellteste beurteilt und selektiv auf MRSA-Agar-Platten ausgestrichen.

Die zu untersuchenden Schnellteste wurden anhand der gewonnenen Daten auf Selektivität, Spezifität und Positiver-, sowie Negativer-Voraussagewerte beurteilt und verglichen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Studie soll es sein, zwei Schnelltestverfahren, das BD GeneOhm™ MRSA und das BacLite Rapid® MRSA⁺, hinsichtlich ihrer Praktikabilität im klinischen Einsatz sowie ihre diagnostischen Parameter zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laboreinrichtungen und Geräte

Brutschrank „Funktion Line“	Heraeus, Hamburg
BacLite® Reader	3M, Neuss
BacLite® Proben-Prozessor	3M, Neuss
Kühl- und Gefrierschränke: verschiedene Modelle	Kirsch, Offenburg
Pipetten: verschiedene Modelle	Eppendorf, Hamburg
PC mit BacLite Systemsoftware	3M, Neuss
Smart Cycler II	Cepheid, Sunnyvale, CA
Stoppuhr	
Tintenstrahl-Drucker	Hewlett-Packard, Böblingen
Vortexer: REAX Top und REAX 2000	Heidolph, Schwabach

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

BacLite® Rapid MRSA+ Reagenz 1	3M, Neuss
BacLite® Rapid MRSA+ Reagenz 1 Verdünnungsmittel	3M, Neuss
BacLite® Rapid MRSA+ Reagenz 2	3M, Neuss
BacLite® Rapid MRSA+ Reagenz 2 Verdünnungsmittel	3M, Neuss
BacLite® Rapid MRSA+ Reagenz 3	3M, Neuss
BacLite® Rapid MRSA+ Capture-Reagenz	3M, Neuss
BacLite® Rapid MRSA+ AK-Kontrolle	3M, Neuss
BacLite® Rapid MRSA+ Supplement: Cefoxitin und Colistin	3M, Neuss

BacLite® Rapid MRSA+ Nährlösung (aus bovinem Material gewonnen)	3M, Neuss
BacLite® Rapid MRSA+ Mikrotiterplatten und Abdeckfolien	3M, Neuss
BacLite® Rapid MRSA+ Abstrichtupfer	3M, Neuss
Bijous	3M, Neuss
Columbia-Blutagar	heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim
Einmalimpfeschlingen: 1 µl und 10 µl loops	Nunc, Roskilde (DN)
Lyseröhrchen (Lysis tube)	
Glasperlen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kontroll-DNA (Control DNA)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Proben-Puffer (Sample buffer)	
Tris-EDTA-Puffer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Plastikstäbchen PP, steril	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg
Pastorex Staph Plus®	Bio-Rad, Laboratories GmbH, München
Pipettenspitzen, verschiedene Größen (teils gestopft)	Sarstedt, Nümbrecht
Smart Cycler-Reaktionsgefäß, 25 µl	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.1.3 Gebrauchtösungen

Aqua bidestillata	Eigenherstellung
Haupt-Mischung (Master mix)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
HCL 25 %	Eigenherstellung
Natriumchlorid 0,9 %	Eigenherstellung
Verdünnungsmittel (Diluent)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.1.4 Software

IDI-MRSA	GeneOhm, San Diego, CA; BD Diagnostics
----------	---

SmartCycler DX software, version 1.7

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenproben

Im Rahmen der regulären Aufnahme wurden insgesamt 497 Patienten über den Zeitraum vom 14.04.2008 bis zum 10.07.2008 in der Poliklinik und der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Münster Nasenabstriche entnommen. Die Abstriche wurden gesammelt, bei 4 °C gelagert und am nachfolgenden Tag morgens abgeholt und in der Diagnostik bearbeitet.

2.2.2 Ausschlusskriterium von Patienten

Es wurden keine Proben von Patienten genommen, die Vicks[®] oder Sinex[®] Nasenspray oder andere Nasensprays mit Antihistaminika, Steroide, Dekongestiva oder antibakteriell wirkende Mittel verabreicht bekommen hatten, um mögliche Auswirkungen auf die Testergebnisse zu vermeiden.

2.2.3 Randomisierung

Pro Patient wurden zwei unabhängige Nasenabstriche durchgeführt. Ein Nasenabstrich wurde mit einem 3M Ami-Swap für das Baclite[®] Gerät und ein Abstrich mit einem Duo-Transswap Amie abgenommen. Der Duo-Transswap wurde für den BD GeneOhm[™] MRSA-Test und die kulturelle Kontrolle verwendet. Um die Randomisierung des zuerst abgenommenen Abstriches zu gewährleisten wurde wie nachfolgend aufgeführt verfahren: In einem DIN-B5 Umschlag wurde der zu erst abzunehmende Nasentupfer mit Anforderungsschein gelegt, zusätzlich wurde ein DIN-Lang Umschlag mit dem zweiten Abstrichtupfer hinzugelegt. So konnte gewährleistet werden, dass die abzunehmenden Abstrichtupfer durch das Krankenhauspersonal randomisiert abgenommen werden konnten.

Die Patientenproben wurden gesammelt und morgens von der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde abgeholt und in die Diagnoseverfahren des BacLite® Rapid MRSA und des BD GeneOhm™ MRSA-Test gegeben. Beide Verfahren wurden nach Herstellerangaben betrieben.

2.2.4 Bedienung des BacLite® Rapid MRSA⁺

Jeder Durchlauf benötigte eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle, die jeden Morgen erneut erstellt wurden. Für die Positiv-Kontrolle wurden einige Kolonien von MRSA ATCC 33592 in 0,9 % NaCl Lösung suspensiert und gevortext, um auf eine Verdünnung von McFarland Standard von 0.5 zu erhalten. Anschließend wurde diese Lösung 1/100 verdünnt und 50 μ l auf einem 3M Ami-Nasentupfer aufgetragen. Für die Negativ-Kontrolle wurden Kolonien von MSSA ATCC 9144 verwendet in 0,9 % NaCl Lösung suspensiert und gevortext, um jedoch eine Verdünnung von McFarland Standard 1.0 zu erreichen. Danach wurden 50 μ l auf einem sterilen Tupfer aufgetragen. Die verwendete Nährlösung wurde einen Tag vorher in den Brutschrank gestellt, um die gewünschte Temperatur von 37 °C zu erreichen. Die Tabletten des Supplement Kits wurden in der Nährlösung vollständig aufgelöst und anschließend wurde jeweils 1 ml dieser Lösung in Bijoux pipetiert. Die Abstrichtupfer der Patienten sowie die Positiv- und Negativ-Kontrolle wurden kopfüber in die Probenbehälter gegeben und an der Kante abgebrochen. Danach wurden die verschlossenen Behälter zweimal für 5 sec. gevortext und im Brutschrank für 2 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.5 Vorbereitung des BacLite® Reader

Der gesamte Inhalt des Reagenz 1 Verdünnungsmittels wurde in den Behälter von Reagenz 1 (Lysophilisiertes Lysostaphin) überführt. Genauso wurde mit den anderen Reagenz 2 (Lyophilisiertes Luciferin) verfahren. Die Reagenz 3 (Naphtholblau) wurde mit keinem Verdünnungsmittel vermischt. Nach kurzem Vortexen wurden die Lö-

sungen für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden mittels der BacLite Software auf dem zur Verfügung gestellten Computer die Reagenzien in den Reader eingesetzt.

2.2.6 Vorbereitung des BacLite® Proben-Prozessor

Innerhalb der ersten 2 h Inkubationsphase wurde der Prozessor vorbereitet. Das Gerät wurde eingeschaltet und nach den Angaben des Herstellers im Benutzerhandbuch auf die Verarbeitung einer MRSA-Titerplatte eingestellt.

2.2.7 Analyseverfahren der Patientenproben

Nach der zweistündigen Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte vorbereitet. Dazu wurden 20 μ l das Capture-Reagenz in die Vertiefungen für die Positiv- und Negativ-Kontrolle und jede, der für die Patientenproben vorgesehenen, Vertiefungen pipetiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Vertiefungen der Antikörper-Kontrolle und die der Nährlösungs-Kontrolle freigelassen wurden. Anschließend wurden die Bijous mit den Patientenproben zweimal für 5 Sekunden mit dem Vortexer geschüttelt und 150 μ l in die beiden nebeneinander liegenden, für diese Probe vorgesehenen Vertiefungen auf der Platte, pipetiert. Danach konnten die Mikrotiterplatte eingesetzt und vom Prozessor bearbeitet werden. Dabei wurden die Proben mit den Magnetpartikeln des Capture-Reagenz vermischt und mehrmals mit Nährlösung gewaschen. Um sicher zu stellen, dass nur *S. aureus* bei der Analyse vorhanden war und alle anderen Mikroben herausgewaschen wurden, wurde dieser Reinigungsschritt durchlaufen.

Nach dem der BacLite® Proben-Prozessor mit dem Reinigungsschritt abgeschlossen war, wurden 20 μ l der AK-Kontrolle in die dafür vorgesehene Vertiefung am Anfang und am Ende der Mikrotiterplatte gegeben. Dann wurde die Mikrotiterplatte in den

BacLite® Reader überführt und die erste Messung gestartet. Damit begann die zweite Inkubation von 2 h.

Die Mikrotiterplatte wurde die ganze Zeit im BacLite® Proben-Prozessor und auch im BacLite® Reader bei 37 °C inkubiert.

Nach der ersten Lesung wurde die Platte mit einer selbstklebenden Abdeckfolie versiegelt und für die restliche Zeit der Inkubation in einen Wärmeschrank bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurde die zweiten Lesung in den BacLite® Reader durchgeführt und die Ergebnisse auf eine MRSA-Anwesenheit automatisch interpretiert.

2.2.9 BD GeneOhm™ MRSA-Test

Jede Patientenprobe wurde in ein sample buffer-Röhrchen gegeben. Dazu wurde der Tupfer an dem Röhrchenrand abgebrochen und fest verschlossen. Alle Proben wurden daraufhin für eine Minute bei maximaler Drehzahl auf dem Vortexer gemischt. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension in ein lysis tube transferiert. Diese wurden für 5 Minuten bei hoher Drehzahl (zwischen 14000g und 21000g) zentrifugiert. Der Überstand wurde danach entfernt und verworfen. Zum verbleibenden Pallet wurde 50 μ l sample buffer hinzugefügt. Anschließend wurden die Probenbehälter für 5 Minuten auf dem Vortexer gemischt und mittels Quick-Spin der Inhalt auf dem Boden des Röhrchens gebracht. Die Behälter wurden dann auf 95 °C für 2 Minuten erhitzt und anschließend sofort auf Eis gegeben.

2.2.10 BD GeneOhm™ MRSA-Testvorgang

In die benötigte Anzahl von master mix-Röhrchen wurde 225 μ l diluent gegeben und anschließend für 5-10 Sekunden auf dem Vortexer gemischt. Dann wurden je 25 μ l des master-mix in die vorgesehenen Smart Cycler® Reaktionsgefäße transferiert und 2,8 μ l von den zuvor lysierten Patientenproben hinzugegeben. Für die Positivkontrolle wurde in ein control DNA-Röhrchen 225 μ l sample buffer gegeben und für 5-10 Sekunden auf dem Vortexer gemischt. Dann wurden 2,8 μ l der Lösung in ein Smart Cycler® Reaktionsgefäß überführt. Für die Negativkontrolle wurden 2,8 μ l vom sample buffer in ein Smart Cycler® Gefäß transferiert. Alle Behälter wurden danach für 5-10 Sekunden zentrifugiert und in den Smart Cycler mit eingestelltem BD GeneOhm™ MRSA-Testprotokoll in ein I-CORE®-Modul eingelegt. Danach wurde der Smart Cycler® gestartet. Die Ergebnisse wurden von der Smart Cycler® Software automatisch interpretiert und ausgegeben.

2.2.11 Kulturbasierte Analysen

Jede Patientenprobe wurde durch eine kulturbasierte Vergleichsanalyse als Goldstandard verglichen. Dazu wurde ein Abstrichtupfer des Duo-Transswap Amie auf einer Columbia-Blutagar Platte in einem drei Ösenausstrich ausgestrichen und danach die Spitze in einer Dextrose-Bouillon ausgedrückt für 24 h bei 37 °C angereichert und danach 10 µl auf einer Columbia-Blutagar Platte ausgestrichen. Die gewachsenen Kulturen wurden mit Pastorex Staph Plus und mittels Vitek-2 identifiziert.

Zusätzlich wurde jede Patientenprobe aus der Analyse des BacLite® MRSA+ nach den ersten 2 h Inkubation s.2.2.4 auf Columbia-Blutagar Platten ausgestrichen und gewachsene Kolonien von *S. aureus* isoliert und kryoarchiviert.

2.2.13 Definition von falsch-positiv und falsch-negativ Ergebnissen

Eine Patientenprobe, die im BacLite® MRSA+ oder im BD GeneOhm™ MRSA-Test als positiv eingestuft wurde und nicht mittels kulturellem Nachweis bestätigt werden konnte, wurde als falsch positiv eingestuft. Vorgesehen war im Studienprotokoll, dass, wenn ein positives Schnelltestergebnis, welches nicht durch das Vitek bestätigt werden konnte, eine DNA-Sequenzierung des Stammes zur abschließenden Einteilung erfolgen sollte. Dies trat jedoch während dieser Studie nicht ein.

3 Ergebnisse

Innerhalb des Zeitraums vom 14.04.08 bis zum 10.07.08 analysierten wir Nasenabstriche von 497 Patienten. Bei fünf Patienten konnte eine MRSA Besiedlung nachgewiesen werden. Die Prävalenz innerhalb der Kohorte entspricht damit 1,0 %.

Insgesamt konnten wir 881 Stämme isolieren, davon waren 729 Koagulase-negative Stämme, worunter sich 625 Methicillin-sensible und 104 Methicillin-resistente Stämme befanden. 152 Stämme konnten als *S. aureus* identifiziert werden, sechs Stämme davon waren MRSA. Bei 32 Patienten konnten keine Besiedlung mit Mikroorganismen erfasst werden s.Tabelle 4.

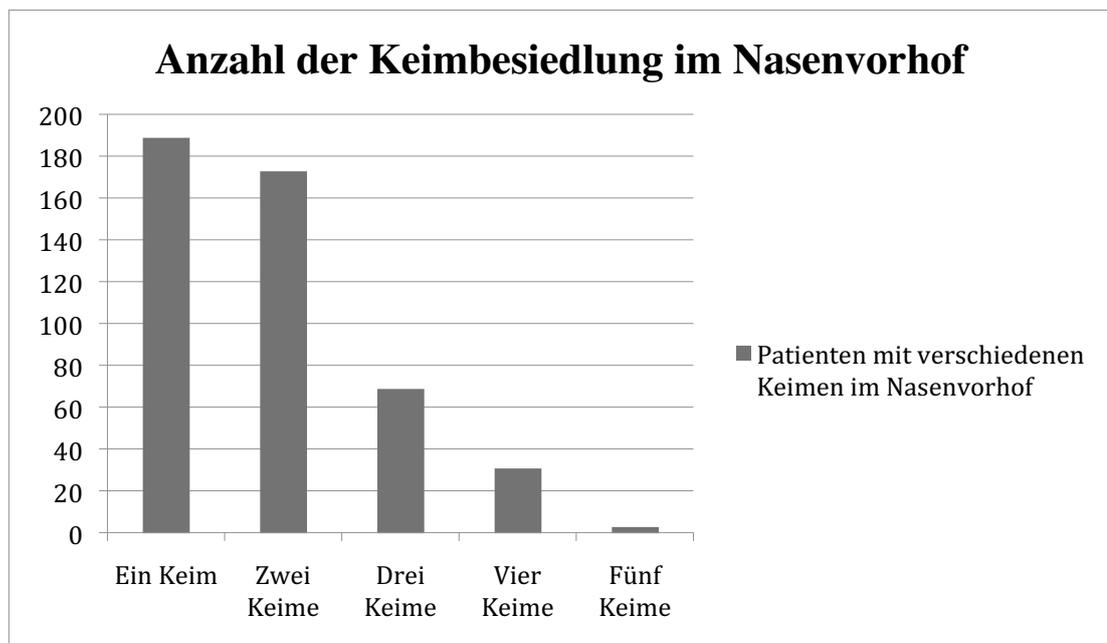
Der BD GeneOhm™ MRSA-Test konnte alle mit MRSA besiedelten Patienten identifizieren. Das BacLite® MRSA+ fand die MRSA Besiedlung bei zwei Patienten. Drei MRSA-Träger wurden von diesem Test nicht entdeckt.

Tabelle 1 Vier Felder Tafel BacLite® Rapid MRSA

	MRSA positiv	MRSA negativ	Summe	Spezifi- tät (%)	Sensitivität (%)	PPV (%)	NPV (%)
Testergebnis positiv	2	8	10	98,37	40,0	20,0	99,38
Testergebnis negativ	3	484	487				
Summe	5	492	497				

Tabelle 2 Vier Felder Tafel BD GeneOhm™ MRSA

	MRSA positiv	MRSA negativ	Summe	Spezifität (%)	Sensitivität (%)	PPV (%)	NPV (%)
Testergebnis positiv	5	5	10	98,98	100,0	50,0	100,0
Testergebnis negativ	0	487	487				
Summe	5	492	497				

**Abbildung 5** Anzahl der Keimbesiedlung im Nasenvorhof

Keiner der Studienteilnehmer wies mehr als fünf verschiedene Keime in seinem Nasenbereich auf.

Tabelle 3 Keimanzahl der Patienten

Patienten mit einem Erreger	Patienten mit zwei Erreger	Patienten mit drei Erreger	Patienten mit vier Erreger	Patienten mit fünf Erreger
189	173	69	31	3

Tabelle 4 Erregerbesiedlungen im Patientenkollektiv

	Ohne Co-Besiedlung	Co-Besiedlung mit			
		MR-CoNS	MS-CoNS	MR + MS-CoNS	
MRSA-Träger	2		2		
MR + MSSA-Träger			1		
MSSA-Träger	24	5	102	7	
Ohne	32	43	245	34	
Gesamt	58	48	350	41	497

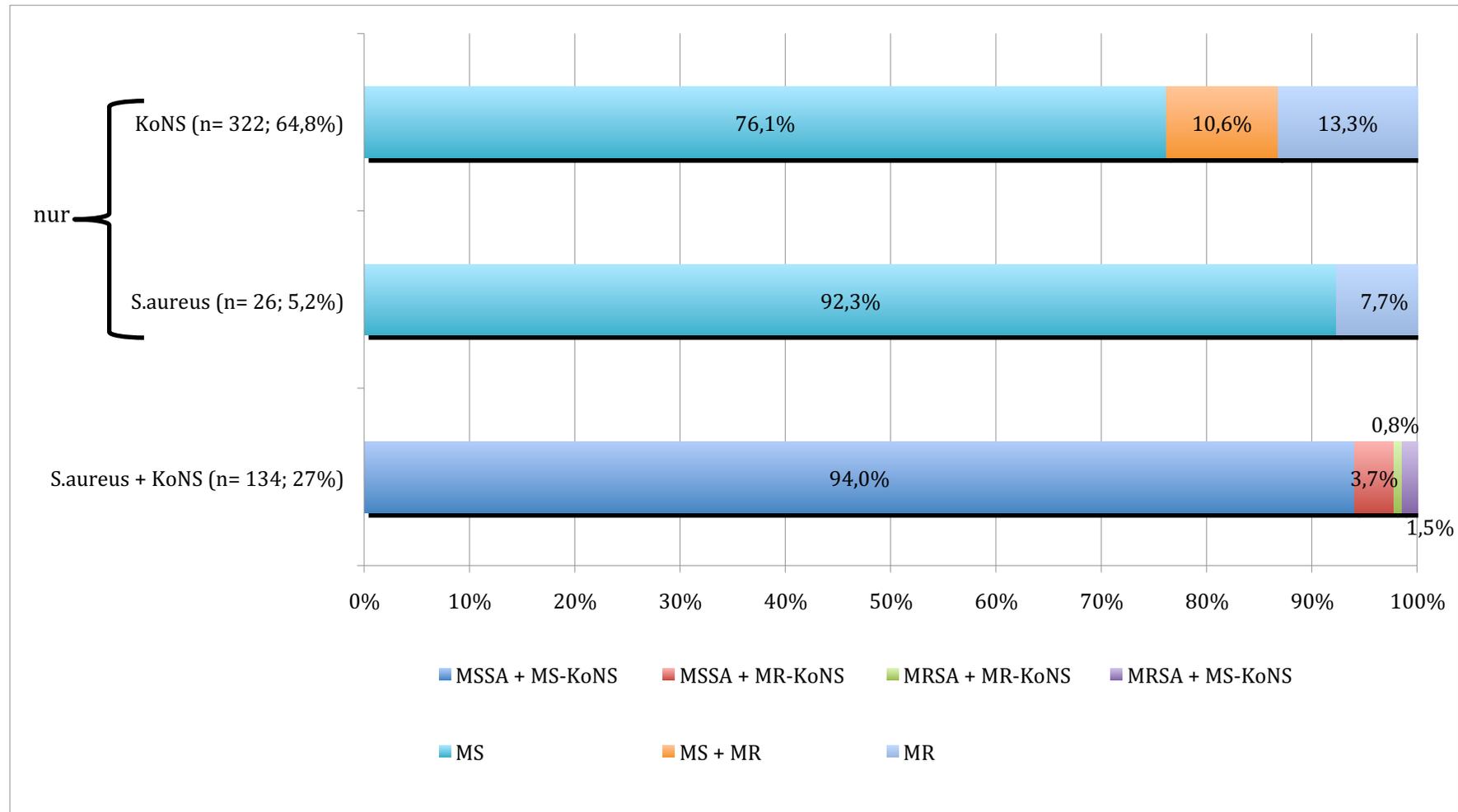


Abbildung 6 Keimbefallung der Patienten aufgeschlüsselt nach Methicillin-Sensibilität

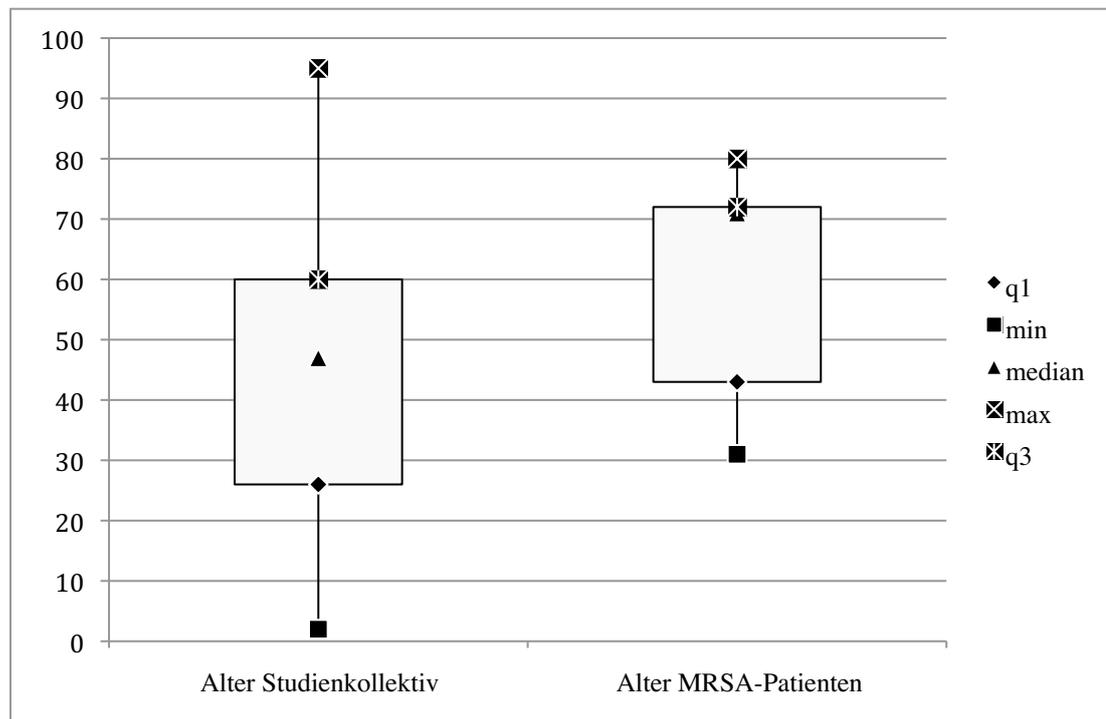


Abbildung 7 Boxensplot Alter der Studienteilnehmer

Das durchschnittliche Alter der MRSA-Keimträger war mit 71 Jahren höher als das aller Patienten im Vergleich mit 47 Jahren.

4 Diskussion

Beide Testsysteme, BD-GeneOhm™ MRSA und BacLite Rapid MRSA⁺ konnten MRSA-Patienten innerhalb der von den Herstellern vorgegeben Referenzgrenzen erkennen. Diese waren für das BacLite Rapid MRSA: 94,6% Sensitivität, 96,9% Spezifität und einen NPV von 99,9%. Für das BD-GeneOhm™ MRSA waren dies: 92,5% Sensitivität, 96,4% Spezifität und ein NPV von 98,2% [1, 7].

Im Vergleich zu unseren Ergebnissen für das BacLite: 40,0% Sensitivität, 98,3% Spezifität und NPV von 99,38%. BD-GeneOhm™: 100,0% Sensitivität, 98,98% Spezifität und ein NPV von 100,0%.

Bei jenen Patienten, bei denen in dieser Studie MRSA nachgewiesen werden konnte, konnte keine vorherige Trägerschaft in der Patientenanamnese erhoben werden. Kein Patient kam aus einem Krankenhausaufenthalt oder war Patient in einer Pflegeeinrichtung. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Altersverteilung. So waren die MRSA-Patienten im Durchschnitt 24 Jahre älter als das Vergleichskollektiv. Dies zeigt sich konform mit der Annahme, dass ältere Patienten eine höhere Wahrscheinlichkeit der Risikofaktoren(s.S.7), wie z.B. Pflegeeinrichtungsaufenthalt oder schwere Grunderkrankungen, für eine MRSA-Besiedlung haben [65].

In unserer vorangehenden Studie zur Evaluation des BacLite Rapid MRSA⁺ konnten wir unter Laborbedingungen alle MRSA-Stämme und alle MSSA-Stämme detektieren [99]. Dieses lässt sich durch das Studiendesign und in der Aufbereitung der Proben erklären. Die getesteten Bakterienkulturen wurden einer Institutssammlung des Mikrobiologischen Instituts Münster entnommen und standardisiert in 0,9 % NaCl-Lösung auf eine Verdünnung von 0.5 McFarland gebracht. Durch diesen Schritt konnten wir eine vergleichbare Bakterienkonzentration gewährleisten. Dies lässt den Schluss zu, dass unsere entnommenen klinischen Proben möglicherweise bei drei Patienten eine zu geringe Bakterienkonzentration aufwiesen, um noch ein positives Testergebnis zu gewährleisten. In den anderen bisherigen Publikationen über das BacLite Rapid MRSA⁺ zeigte sich eine Sensitivität von 94,6 % und 95,9 % sowie eine

Spezifität von 96,9 % und 88,8 % [53, 72]. Die Spezifität liegt mit 98,4 % in unserem Testergebnis sowohl über den der bisherigen Studien als auch den Angaben des Herstellers. Mit 40,0 % weicht jedoch die Sensitivität von den bisher gemessenen Werten ab. Wir konnten keinen systemischen Fehler für diese Abweichung ausmachen. Es ist bekannt, dass MRSA-Stämme unterschiedliche MHK (Minimale Hemmkonzentration)-Werte für Cefoxitin besitzen. Es wäre möglich, dass die verwendete Konzentration weit über dem MHK-Wert der MRSA-Stämme lag und daher das Wachstum von Stämmen mit geringeren MHK-Werten durch das Antibiotikum unterdrückt wurden. Damit wäre kein ausreichendes Bakterienwachstum erzielt um eine MRSA Detektion zu ermöglichen. Auf den Blutagarplatten konnten Kulturen dieser Stämme angezüchtet werden, sie hatten jedoch eine längere Inkubationszeit von 24 h. Die kurze Inkubationszeit von vier Stunden beim Testverfahren des BacLite Rapid MRSA⁺ könnte ein wesentlicher Grund für die geringere Erkennungsrate sein. Das BD GeneOhmTM MRSA operierte innerhalb der erwarteten Werte, die von vielen anderen Studien beschrieben wurden [8, 11, 20, 22, 23, 28, 47]. Allein der positive prädiktive Wert lag durch die vielen falsch positiven Ergebnissen bei 50,0 %. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei einigen Stämmen das entsprechende genetische mobile Element, also das SCCmec-Element, vorhanden war, jedoch das Gen *mecA* fehlte und daher keine Resistenz gegenüber Methicillin ausgebildet werden konnte. Diese SCCmec-Kassettenreste ohne das *mecA*-Gen oder andere SCC, die kein *mecA*-Gen, dafür aber andere Gensequenzen tragen, die nicht das PBP2a produzieren, können für falsch-positive Ergebnisse verantwortlich sein (sog. drop-out-Stämme) [19, 43, 50, 85]. Dadurch, dass der Test nicht das *mecA* direkt nachweist, können falsch positive Ergebnisse bei MSSA auftreten.

Weitere falsch-positive Ergebnisse können möglicherweise von *mecA*-positiven Koagulase-negativen *Staphylococcus* spp. durch homologe *orfX* Genabschnitte erzeugt werden [29]. Solche Stämme sind bisher jedoch nicht publiziert worden.

Ein Nachteil des molekularen Nachweisverfahrens besteht darin, dass die hohe genetische Variabilität innerhalb der SCCmec nicht durch den BD GeneOhm MRSA Test

kompensiert werden können [27]. Die verwendeten Primer sind nur in der Lage an den vorgewählten Varianten der *SCCmec* und des *orfX* Abschnitts zu binden. Weist eine der beiden Stellen eine Mutation auf, ist der Test unter Umständen – je nach Primerbindungsverhalten - nicht mehr in der Lage ein positives Ergebnis zu liefern. Trotzdem kann es sich um einen MRSA handeln. Dies kann nur durch Ergänzung neuer Primer für neue *SCCmec*-Varianten aufgefangen werden, welches eine ständige Adaptation des Herstellers auf neue (Sub)Klassen nötig macht. Bis diese Primer zur Verfügung stehen kann jedoch ein MRSA-Stamm eine unbemerkte Besiedlung in der Bevölkerung vornehmen. Gleichzeitig muss bedacht werden, dass ein hinzufügen weiterer Primer eine Steigerung der Fehlerquote zur Folge haben kann, da diese wieder eine Interaktion untereinander eingehen können. Erst kürzlich ist eine neue Variante des *mecA* Gen-Abschnitts, dem *mecA_{LGA251}* entdeckt worden. Dieser Genabschnitt zeigt zusätzlich neue Verhaltenweisen bei der etablierten Standard-Diagnostik. So zeigen Latex-Tests bei diesem Stamm keine verlässlichen positiven Ergebnisse [60].

Da das BacLite Rapid MRSA+ nur die phänotypische Eigenschaft der Methicillin-Resistenz testet, ist es unempfindlich für stille Mutationen. Auch zukünftige MRSA-Stämme sind durch diese Methode zu detektieren. Das ist ein Vorteil gegenüber der reinen molekularen Analyse.

4.1 Vergleich BD GeneOhm MRSA mit BacLite Rapid MRSA+

Beide Schnellteste zeigen, dass sie in der Lage sind, eine MRSA Trägerschaft zu erkennen. Das BD GeneOhmTM MRSA Testsystem konnte in unserer Studie alle fünf Träger erkennen und hat weitere fünf Patienten falsch-positiv bewertet. Das BacLite Rapid MRSA⁺ konnte von fünf MRSA Patienten nur zwei erkennen und hat acht Patienten falsch-positiv bewertet. Bei dem Einsatz dieses Gerätes wären bei der Search and Destroy-Strategie drei Patienten nicht erkannt worden und hätten den MRSA-Erreger auf andere Patienten oder das Krankenhauspersonal übertragen können.

Das BD-GeneOhm MRSA zeigt eine deutlich zuverlässigere Detektion von MRSA mit der Sensitivität von 100,0% und einen NPV von 100,0% kann sehr sicher eine Besiedlung erkannt werden. Ein negatives Ergebnis kann sicher als solches gewertet werden. Gerade im klinischen Alltag ist dies ein wichtiges Merkmal eines Screening-tests. Auch wenn unsere Ergebnisse über den Herstellerangaben liegen, wäre bei entsprechender Anzahl von Patienten sicher ein falsch-negatives Testergebnis zu erwarten, gerade in Anbetracht, dass nicht alle *SCC_{mec}* Sub-Typen erkannt werden können. Das Baclite-Testverfahren zeigte sich nicht so zuverlässig. Mit einer Sensitivität von 40,0% und einem NPV von 99,38% ist die Aussage über ein negatives Ergebnis zwar zuverlässig, jedoch werden nicht einmal die Hälfte aller MRSA Besiedlungen erkannt.

Bei beiden Geräten wären die gleichen Kosten für Isolation und Pflegebetreuung aufgetreten, da beide Geräte insgesamt bei zehn Patienten ein positives Testergebnis lieferten. Beim BD GeneOhm MRSA wären alle Patienten, die wir in dieser Studie als MRSA-Träger erkennen konnten, isoliert und behandelt worden, dies zeigt ein besseres Kosten/Nutzenverhältnis und hätte die größtmögliche Sicherheit für Patienten und Krankenhauspersonal gewährleistet.

Die Besiedlung mit MRSA innerhalb unserer Patientenkohorte bei *S. aureus* Trägern liegt mit 3,5 % weit unter der durchschnittlich bestimmten Besiedlung von 20,0 %, die für Deutschland angegeben wird [91]. Sie entspricht damit einem Low-Prävalenz-Setting, wie für die Niederlande und Skandinavien beschrieben. Ein möglicher Grund könnte das MRSA-net des Euregio-Projekts Twente/Münsterland sein. Ziel dieses Projektes ist die grenzüberschreitende Vernetzung von Gesundheitseinrichtungen und Kliniken, um die MRSA-Rate auf der deutschen Seite zu erfassen und langfristig auf das niederländische Niveau abzusenken [21, 25, 31, 57]. Um eine mögliche Keimbesiedlung zu Beginn des Krankenhausaufenthalts zu entdecken, wurden Verfahren mit den Krankenhäusern abgesprochen, welche die Patienten wirksam isolieren und so einer MRSA-Ausbreitung entgegenwirken können. Das

Krankenhauspersonal wurde im Umgang mit MRSA-Patienten geschult und einheitliche Standards etabliert.

In den Niederlanden herrscht eine sehr geringe Rate von MRSA. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass diese Zahlen stabil bleiben, während fast weltweit die MRSA-Rate zunimmt [69, 102]. Dies kann als ein Erfolg der zwar kostenintensiven, aber wirksamen, aktuellen Verfahrensweise in den Niederlanden gesehen werden.

Die Effizienz dieses Vorgehens zeigte sich besonders deutlich bei einem „MRSA-Ausbruch“ in der Region Rijnmond im Jahre 2000 [101, 103]. Nachdem über mehrere Jahre in dieser Region die MRSA-Prävalenz mit einem MRSA-Klon USA 300 von 3,0 % auf 33,0 % anstieg. Als Fehlerquelle konnte ein nicht ausreichendes Nachweisverfahren für diesen Klon ausgemacht werden. Durch diesen systemischen Fehler, konnte sich MRSA USA 300 als CA-MRSA innerhalb der Bevölkerung ausbreiten. Nach der Entdeckung wurden die Testverfahren angepasst und durch Anwendung der Search and Destroy- Police konnte die MRSA-Prävalenz wieder auf landestypische Werte gebracht werden.

Es zeigte sich hier, dass sich die Stämme auf andere Personen ausbreiten können, wenn MRSA-Raten nicht entdeckt und effektiv bekämpft werden. Auf der anderen Seite kann mit der Search and Destroy- Police die Anzahl der MRSA-Keimträger zudem deutlich reduziert werden. Dadurch können Antibiotikatherapien wieder angewandt werden, die auf den MRSA-Keim keine Wirkung gehabt hätten.

In Deutschland herrscht im Mittel eine höhere Prävalenz als in Skandinavien und den Niederlanden, so wären eine Search and Destroy-Police zu Beginn teurer als die Isolationskosten der „zufällig“ aufgefallenen MRSA Patienten, dies würde sich aber bei einem konsequenten Vorgehen schnell rechnen, wenn die Raten von MRSA gesenkt werden können. Eine Senkung auf unter 1,0 % wäre schon nach sechs Jahren möglich, wenn die Search and Destroy-Police konsequent angewandt würde.[10, 18]

Von dem Kostenaufwand abgesehen, würde mit diesen Maßnahmen bei vielen Patienten eine Infektion mit MRSA vermieden und ein möglicher letaler Krankheitsver-

lauf abgewendet werden können. Eine Untersuchung von Gastmeier et al. bestätigt, dass es in Deutschland ca. 400.000 – 600.000 nosokomiale Infektionen und ca. 7.500 – 15.000 damit verbundene Todesfälle gibt, wovon 1.500 – 4.500 Tode vermeidbar sein könnten [34]. In Intensivstationen verursacht MRSA 16.3 % von diesen nosokomialen Infektionen [35]. Dies würde ca. 1.200 – 2.500 Fällen im Jahr nach der Annahme von Gastmeier et al. bezogen auf Patienten in Intensivstationen entsprechen und nach Resch et al. gibt es knapp 93.000 MRSA Fälle in Deutschland. Würden die Ergebnisse unserer Studie auf diese Fallzahlen angewandt, könnten alle MRSA besiedelten Patienten durch das BD-GeneOhm aufgedeckt und entsprechend behandelt werden. Es ergibt sich demnach ein großes Potential für die Patientensicherheit in Deutschland. Das BacLite Rapid MRSA+ hätte von den angenommenen ca. 14.000 nosokomialen MRSA-Fällen in 2006 [33], wenn wir unsere Ergebnisse zu Grunde legen, nur 5600 erkannt. 8400 MRSA Besiedlungen wäre nicht erkannt worden.

Wie neuste Untersuchungen zeigen ist *S. epidermidis* in der Lage die Besiedlung von *S. aureus* durch eine Serin-Protease zu hemmen [49]. Dies lässt den Schluss zu, dass *S. epidermidis* besiedelte Patienten seltener zusätzlich *S. aureus* Keimträger sind. Neue mögliche Therapieoptionen, die die Serin-Protease nutzen, könnten sich dadurch ergeben. Jedoch sind solche neuen Therapien nicht kurzfristig verfügbar. Auch kürzliche aufgezeigte Konkurrenz zwischen verschiedenen, die Nase kolonisierenden Spezies, einschl. *S. aureus*, können evtl. zukünftig alternative Wege zur Eradizierung eines MRSA-Trägertums aufzeigen [108].

Bei ansteigender Resistenz der Keime zeigt dies einen Therapieengpass auf. Daher müssen Schnelltestverfahren in der täglichen Routine-Diagnostik eingesetzt werden, um eine Verbreitung dieser resistenten Stämme zu verhindern und den MRSA-Träger dekolonisieren zu können. Die Kosten für das Gesundheitssystem können so limitiert und die Gefahr für den Patienten und das Pflegepersonal abgewendet werden.

Schnellteste sind nicht in der Lage Kulturverfahren zu ersetzen, sie können nur ergänzend im Krankenhaus- und Pflegemanagement eine frühzeitige Aussage über notwendige Verhaltens- und Therapiemaßnahmen machen. Jeder positiv getestete Patient muss zur Verifikation kulturtechnisch gegen geprüft werden. Nur so lassen sich falsch-positive Testergebnisse filtern und komplette Resistenztestungen respektive Genotypisierung durchführen. Erst dadurch wird es möglich alternative Antibiotikatherapien effektiv einzusetzen. Daher wird auch in Zukunft der kulturelle Nachweis notwendig und als Gold-Standard erhalten bleiben.

4.3 Ausblick

Das molekulargenetische Nachweisverfahren BD GeneOhm zeigt eine bessere Zuverlässigkeit mit einer Sensitivität von 100,0% einer Spezifität von 98,98% S und einem NPV von 100,0%. Unsere Ergebnissen für das BacLite Rapid MRSA⁺ im Vergleich zeigte eine Sensitivität von 40,0%, eine Spezifität von 98,3% und NPV von 99,38%. Implementiert in einer Search and Destroy-Strategie kann ein molekularer Schnelltest die MRSA besiedelten Patienten aufspüren, gefährliche Erkrankungen vermeiden und helfen Kosten zu sparen. Das BD GeneOhmTM MRSA-Testsystem stellt nach den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen eine sensitive und spezifische Schnelltest-Methode zum MRSA-Screening dar. In Einklang mit unseren Erhebungen hat der Hersteller 3M das Gerät BacLite Rapid MRSA⁺, wegen unzureichender Aussichten und nicht erfüllter Erwartungen, vom Markt genommen.

5 Literaturverzeichnis

- [1] **Acolyte-Biomedica** (2007) Baclite Rapide MRSA+ User Instruction. 500901.2 ed. In: Salisbury, Neuss u.a. S 29-42.
- [2] **Baba T, Kuwahara-Arai K, Uchiyama I, Takeuchi F, Ito T, Hiramatsu K** (2009) Complete genome sequence of *Micrococcus caseolyticus* strain JCSCS5402, [corrected] reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *J Bacteriol* 191(4):1180-90.
- [3] **Becker K** (2005) Die Bestimmung der Methicillin-Resistenz bei *Staphylococcus aureus*. In: Quintel M, Witte W, (Hrsg) MRSA - eine interdisziplinäre Herausforderung. Sociomedico Verlag, Wessobrunn S 59-103.
- [4] **Becker K, Friedrich AW, Peters G, von Eiff C** (2004) Systematic survey on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SEIM, SEIO, and SEIN. *Mol Nutr Food Res* 48(7):488-95.
- [5] **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 by molecular methods? *J Clin Microbiol* 44(1):229-31.
- [6] **Becker K, Bierbaum G, von Eiff C, Engelmann S, Gotz F, Hacker J, Hecker M, Peters G, Rosenstein R, Ziebuhr W** (2007) Understanding the physiology and adaptation of staphylococci: a post-genomic approach. *Int J Med Microbiol* 297(7-8):483-501.
- [7] **Becton-Dickinson-Diagnostics** (2008) BD GeneOhm MRSA Assay. DOPS03-09-V3M1 ed. In: Québec, Heidelberg u.a. S 25-35.
- [8] **Bishop EJ, Grabsch EA, Ballard SA, Mayall B, Xie S, Martin R, Grayson ML** (2006) Concurrent analysis of nose and groin swab specimens

- by the IDI-MRSA PCR assay is comparable to analysis by individual-specimen PCR and routine culture assays for detection of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 44(8):2904-8.
- [9] **Bocher S, Skov RL, Knudsen MA, Guardabassi L, Molbak K, Schouenborg P, Sorum M, Westh H** (2009) The Search and Destroy Strategy Prevents Spread and Long-term Carriage of MRSA; Results from Follow-up Screening of a Large ST22 (E-MRSA 15) Outbreak in Denmark. *Clin Microbiol Infect*.
- [10] **Bootsma MC, Diekmann O, Bonten MJ** (2006) Controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: quantifying the effects of interventions and rapid diagnostic testing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14):5620-5.
- [11] **Boyce JM, Havill NL** (2008) Comparison of BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PCR versus the CHROMagar MRSA assay for screening patients for the presence of MRSA strains. *J Clin Microbiol* 46(1):350-1.
- [12] **Brasel KJ, Weigelt JA** (2008) Community-Acquired MRSA as a Pathogen. In: Weigelt JA, (Hrsg) MRSA. Informa Healthcare, New York London S 43-54.
- [13] **Chambers HF** (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infect Dis* 7(2):178-82.
- [14] **Centers for Disease Control** (2002) *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin -- United States. *JAMA* 288(7):824-5.
- [15] **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(2):166-74.
- [16] **Courvalin P** (2006) Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 42 Suppl 1:S25-34.

- [17] **Critchley IA, Blosser-Middleton RS, Jones ME, Thornsberry C, Sahn DF, Karlowsky JA** (2003) Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001. *Antimicrob Agents Chemother* 47(5):1689-93.
- [18] **Cunningham R, Jenks P, Northwood J, Wallis M, Ferguson S, Hunt S** (2007) Effect on MRSA transmission of rapid PCR testing of patients admitted to critical care. *J Hosp Infect* 65(1):24-8.
- [19] **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(10):834-7.
- [20] **Dalla Valle C, Pasca MR, De Vitis D, Marzani FC, Emmi V, Marone P** (2009) Control of MRSA infection and colonisation in an intensive care unit by GeneOhm MRSA assay and culture methods. *BMC Infect Dis* 9:137.
- [21] **Daniels-Haardt I, Verhoeven F, Mellmann A, Hendrix MG, Gemert-Pijnen JE, Friedrich AW** (2006) [EUREGIO-projekt MRSA-net Twente/Munsterland. Creation of a regional network to combat MRSA]. *Gesundheitswesen* 68(11):674-8.
- [22] **de San N, Denis O, Gasasira M-F, De Mendonça R, Nonhoff C, Struelens MJ** (2007) Controlled evaluation of the IDI-MRSA assay for detection of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in diverse mucocutaneous specimens. *J Clin Microbiol* 45(4):1098-101.
- [23] **Desjardins M, Guibord C, Lalonde B, Teye 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(4):1219-23.
- [24] **Deurenberg RH, Stobberingh EE** (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 8(6):747-63.

- [25] **Deurenberg RH, Nulens E, Valvatne H, Sebastian S, Driessen C, Craeghs J, De Brauwere E, Heising B, Kraat YJ, Riebe J, Stals FS, Trienekens TA, Scheres J, Friedrich AW, van Tiel FH, Beisser PS, Stobberingh EE** (2009) Cross-border dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Euregio Meuse-Rhin region. *Emerg Infect Dis* 15(5):727-34.
- [26] **Devine J, Cooke RP, Wright EP** (2001) Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) contamination of ward-based computer terminals a surrogate marker for nosocomial MRSA transmission and handwashing compliance? *J Hosp Infect* 48(1):72-5.
- [27] **Donnio PY, Oliveira DC, Faria NA, Wilhelm N, Le Coustumier A, de Lencastre H** (2005) Partial excision of the chromosomal cassette containing the methicillin resistance determinant results in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43(8):4191-3.
- [28] **Drews SJ, Willey BM, Kreiswirth N, Wang M, Ianes T, Mitchell J, Latchford M, McGeer AJ, Katz KC** (2006) Verification of the IDI-MRSA assay for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in diverse specimen types in a core clinical laboratory setting. *J Clin Microbiol* 44(10):3794-6.
- [29] **Francois P, Bento M, Renzi G, Harbarth S, Pittet D, Schrenzel J** (2007) Evaluation of three molecular assays for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 45(6):2011-3.
- [30] **Friedrich AW** (2009) [EUREGIO MRSA-net Twente/Munsterland: "search & follow" by Euregional network building]. *Gesundheitswesen* 71(11):766-70.
- [31] **Friedrich AW, Daniels-Haardt I, Kock R, Verhoeven F, Mellmann A, Harmsen D, van Gemert-Pijnen JE, Becker K, Hendrix MG** (2008) EUREGIO MRSA-net Twente/Munsterland--a Dutch-German cross-border network for the prevention and control of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Euro Surveill* 13(35).

- [32] **Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA** (2011) Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 11(8):595-603.
- [33] **Gastmeier P, Geffers C** (2008) [Nosocomial infections in Germany. What are the numbers, based on the estimates for 2006?]. *Dtsch Med Wochenschr* 133(21):1111-5.
- [34] **Gastmeier P, Brunkhorst F, Schrappe M, Kern W, Geffers C** (2009) [How many nosocomial infections are avoidable?]. *Dtsch Med Wochenschr* 135(3):91-3.
- [35] **Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Behnke M, Daschner F, Rüden H** (2005) Mortality risk factors with nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in intensive care units: results from the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS). *Infection* 33(2):50-5.
- [36] **Gavaldà L, Masuet C, Beltran J, Garcia M, Garcia D, Sirvent JM, Ramon JM** (2006) Comparative cost of selective screening to prevent transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), compared with the attributable costs of MRSA infection. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 27(11):1264-6.
- [37] **Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E** (2006) Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368(9538):874-85.
- [38] **Halle E, Majcher-Peszynska J, Drewelow B** (2002) Linezolid: das erste Antibiotikum aus der Klasse der Oxazolidinone. *Chemotherapie Journal* 11:1-11.

- [39] **Hanssen AM, Ericson Sollid JU** (2006) SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46(1):8-20.
- [40] **Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JU** (2004) Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother* 48(1):285-96.
- [41] **Herr CE, 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(9):673-8.
- [42] **Hogue JS, Buttke P, Braun LE, Fairchok MP** (2010) Mupirocin Resistance Related to Increasing Mupirocin Use in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Pediatric Population. *J Clin Microbiol*.
- [43] **Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, Foster TJ, Moore CE, Hurst L, Atkin R, Barron A, Bason N, Bentley SD, Chillingworth C, Chillingworth T, Churcher C, Clark L, Corton C, Cronin A, Doggett J, Dowd L, Feltwell T, Hance Z, Harris B, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, James KD, Lennard N, Line A, Mayes R, Moule S, Mungall K, Ormond D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Sanders M, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG, Spratt BG, Parkhill J** (2004) Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26):9786-91.
- [44] **Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuvél MG, Heck ME, Pluister GN, Voss A, Wannet WJ, de Neeling AJ** (2006) Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5:26.

- [45] **Hurdle JG, O'Neill AJ, Mody L, Chopra I, Bradley SF** (2005) In vivo transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with failure of mupirocin prophylaxis. *J Antimicrob Chemother* 56(6):1166-8.
- [46] **International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements, (IWG-SCC)** (2009) Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 53(12):4961-7.
- [47] **Ishikawa H, Kutsukake E, Chiba K, Fukui T, Matsumoto T** (2010) The performance of the BD geneOhm MRSA assay for MRSA isolated from clinical patients in Japan, including the effects of specimen contamination and ways to improve it. *J Infect Chemother*.
- [48] **Ito T, Kuwahara K, Hiramatsu K** (2007) Staphylococcal cassette chromosome mec(SCC mec) analysis of MRSA. *Methods Mol Biol* 391:87-102.
- [49] **Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, Agata T, Mizunoe Y** (2010) *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 465(7296):346-9.
- [50] **Jansen WT, Beitsma MM, Koeman CJ, van Wamel WJ, Verhoef J, Fluit AC** (2006) Novel mobile variants of staphylococcal cassette chromosome mec in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 50(6):2072-8.
- [51] **Jernigan JA, Titus MG, Groschel DH, Getchell-White S, Farr BM** (1996) Effectiveness of contact isolation during a hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Epidemiol* 143(5):496-504.
- [52] **Jevons M** (1961) Celbenin-resistant staphylococci. *Br Med J*.
- [53] **Johnson G, Millar MR, Matthews S, Skyrme M, Marsh P, Barringer E, O'Hara S, Wilks M** (2006) Evaluation of BacLite Rapid MRSA, a rapid culture based screening test for the detection of ciprofloxacin and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) from screening swabs. *BMC Microbiol* 6:83.

- [54] **Kayser FH, Böttger EC** (2005) Bakterien als Krankheitserreger. In: Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P, (Hrsg) Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York S 245-50.
- [55] **Kern WV, Dettenkofer M** (2009) [Nosocomial infections: MRSA und CDAD as a challenge]. *Der Internist* 50(6):691-703; quiz 4-5.
- [56] **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(4):1956-9.
- [57] **Köck R, Brakensiek L, Mellmann A, Kipp F, Henderikx M, Harmsen D, Daniels-Haardt I, von Eiff C, Becker K, Hendrix MG, Friedrich AW** (2009) Cross-border comparison of the admission prevalence and clonal structure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 71(4):320-6.
- [58] **Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torne A, Witte W, Friedrich AW** (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill* 15(41):19688.
- [59] **Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention** (1999) Empfehlung zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 42:954-8.
- [60] **Kriegeskorte A, Ballhausen B, Idelevich EA, Köck R, Friedrich AW, Karch H, Peters G, Becker K** (2012) Human MRSA Isolates with Novel Genetic Homolog, Germany. *Emerg Infect Dis* 18(6):1016-8.

- [61] **Kriegeskorte A, König S, Sander G, Pirkl A, Mahabir E, Proctor RA, von Eiff C, Peters G, Becker K** (2011) Small colony variants of *Staphylococcus aureus* reveal distinct protein profiles. *Proteomics* 11(12):2476-90.
- [62] **Kuhl SA, Pattee PA, Baldwin JN** (1978) Chromosomal map location of the methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 135(2):460-5.
- [63] **Laupland KB, Conly JM** (2003) Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization and prophylaxis for infection with topical intranasal mupirocin: an evidence-based review. *Clin Infect Dis* 37(7):933-8.
- [64] **Lowy FD** (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339(8):520-32.
- [65] **Lucet JC, Grenet K, Armand-Lefevre L, Harnal M, Bouvet E, Regnier B, Andreumont A** (2005) High prevalence of carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission in elderly patients: implications for infection control strategies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26(2):121-6.
- [66] **MacKenzie FM, Bruce J, Struelens MJ, Goossens H, Mollison J, Gould IM** (2007) Antimicrobial drug use and infection control practices associated with the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in European hospitals. *Clin Microbiol Infect* 13(3):269-76.
- [67] **Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M** (2001) Antibakteriell wirksame Pharmaka mit Angriff an der Zellwandsynthese. In: Mutschler *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart S 799-800.
- [68] **Nienhoff U, Kadlec K, Chaberny IF, Verspohl J, Gerlach GF, Schwarz S, Simon D, Nolte I** (2009) Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports. *J Antimicrob Chemother* 64(3):660-2.

- [69] **Noskin GA, Rubin RJ, Schentag JJ, Kluytmans J, Hedblom EC, Jacobson C, Smulders M, Gemmen E, Bharmal M** (2007) National trends in *Staphylococcus aureus* infection rates: impact on economic burden and mortality over a 6-year period (1998-2003). *Clin Infect Dis* 45(9):1132-40.
- [70] **Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenbergh MF, Boelens HA, Hofman A, van Belkum A, Verbrugh HA** (2004) Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a "culture rule". *Clin Infect Dis* 39(6):806-11.
- [71] **Nulens E, Broeex E, Ament A, Deurenberg RH, Smeets E, Scheres J, van Tiel FH, Gordts B, Stobberingh EE** (2008) Cost of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy in a Dutch university hospital. *J Hosp Infect* 68(4):301-7.
- [72] **Ohara S, Malhotra-Kumar S, Haccuria K, Van Heirstraeten L, Ieven M, Goossens H** (2008) Novel rapid culture-based detection method for methicillin-resistant *Staphylococcus* [corrected] *aureus*. *J Clin Microbiol* 46(9):3181; author reply 381-2.
- [73] **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(11):4289-94.
- [74] **Oliveira DC, de Lencastre H** (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46(7):2155-61.
- [75] **Oztoprak N, Cevik MA, Akinci E, Korkmaz M, Erbay A, Eren SS, Balaban N, Bodur H** (2006) Risk factors for ICU-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Am J Infect Control* 34(1):1-5.

- [76] **Patel JB, Gorwitz RJ, Jernigan JA** (2009) Mupirocin resistance. *Clin Infect Dis* 49(6):935-41.
- [77] **Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G** (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 4(4):295-305.
- [78] **Reed LR** (2008) Antibiotics for MRSA Infections. In: Weigelt JA, (Hrsg) MRSA. Informa Healthcare, New York London S 147-66.
- [79] **Resch A, Wilke M, Fink C** (2009) The cost of resistance: incremental cost of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in German hospitals. *The European journal of health economics : HEPAC : health economics in prevention and care* 10(3):287-97.
- [80] **Rezende NA, Blumberg HM, Metzger BS, Larsen NM, Ray SM, McGowan JE, Jr.** (2002) Risk factors for methicillin-resistance among patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia at the time of hospital admission. *Am J Med Sci* 323(3):117-23.
- [81] **Robert Koch Institut** (2007) Ein regionales Netzwerk zur Prävention und Kontrolle von Infektionen durch MRSA: EUREGIO MRSA-net Twente/Münsterland. *Epidemiologisches Bulletin* 33:307-11.
- [82] **Robert Koch Institut** (2009) Einführung der Labormeldepflicht für den Nachweis von MRSA aus Blut oder Liquor zum 01. Juli 2009. *Epidemiologisches Bulletin* 26:252-3.
- [83] **Robert Koch Institut** (2011) Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010. *Epidemiologisches Bulletin* 26:233-44.
- [84] **Schroeder A, Schroeder MA, D'Amico F** (2009) What's growing on your stethoscope? (And what you can do about it). *J Fam Pract* 58(8):404-9.
- [85] **Shore AC, Rossney AS, O'Connell B, Herra CM, Sullivan DJ, Humphreys H, Coleman DC** (2008) Detection of staphylococcal cassette chromosome mec-associated DNA segments in multiresistant methicillin-

- susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and identification of *Staphylococcus epidermidis* ccrAB4 in both methicillin-resistant *S. aureus* and MSSA. *Antimicrob Agents Chemother* 52(12):4407-19.
- [86] **Silverman JA, Oliver N, Andrew T, Li T** (2001) Resistance studies with daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 45(6):1799-802.
- [87] **Silverman JA, Mortin LI, Vanpraagh AD, Li T, Alder J** (2005) Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. *J Infect Dis* 191(12):2149-52.
- [88] **Simor AE, Stuart TL, Louie L, Watt C, Ofner-Agostini M, Gravel D, Mulvey M, Loeb M, McGeer A, Bryce E, Matlow A** (2007) Mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 51(11):3880-6.
- [89] **Sjostrom JE, Lofdahl S, Philipson L** (1975) Transformation reveals a chromosomal locus of the gene(s) for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 123(3):905-15.
- [90] **Stevens D** (2008) Genetics of MRSA: The United States and Worldwide. In: Weigelt JA, (Hrsg) MRSA. Informa Healthcare, New York London S 31-41.
- [91] **System EARS European Antimicrobial Resistance Surveillance System** (2008) EARSS Annual Report 2007.1-156
- [92] **Treakle AM, Thom KA, Furuno JP, Strauss SM, Harris AD, Perencevich EN** (2009) Bacterial contamination of health care workers' white coats. *Am J Infect Control* 37(2):101-5.
- [93] **Tuscherr L, Medina E, Hussain M, Volker W, Heitmann V, Niemann S, Holzinger D, Roth J, Proctor RA, Becker K, Peters G, Loffler B** (2011) *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 3(3):129-41.

- [94] **van Rijen MM, Van Keulen PH, Kluytmans JA** (2008) Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming. *Clin Infect Dis* 46(2):261-3.
- [95] **VandenBergh MF, Yzerman EP, van Belkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA** (1999) Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol* 37(10):3133-40.
- [96] **Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J** (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9(8):978-84.
- [97] **von Eiff C** (2008) *Staphylococcus aureus* small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. *Int J Antimicrob Agents* 31(6):507-10.
- [98] **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(1):11-6.
- [99] **von Eiff C, Maas D, Sander G, Friedrich AW, Peters G, Becker K** (2008) Microbiological evaluation of a new growth-based approach for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 61(6):1277-80.
- [100] **von Eiff C, Taylor KL, Mellmann A, Fattom AI, Friedrich AW, Peters G, Becker K** (2007) Distribution of capsular and surface polysaccharide serotypes of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58(3):297-302.
- [101] **Vos MC, Ott A, Verbrugh HA** (2005) Successful search-and-destroy policy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 43(4):2034; author reply -5.

- [102] **Vos MC, Behrendt MD, Melles DC, Mollema FP, de Groot W, Parlevliet G, Ott A, Horst-Kreft D, van Belkum A, Verbrugh HA** (2009) 5 years of experience implementing a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy at the largest university medical center in the Netherlands. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30(10):977-84.
- [103] **Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Willems RJ, De Neeling AJ** (2004) Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic berlin methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone with low-level resistance to oxacillin. *J Clin Microbiol* 42(7):3077-82.
- [104] **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. *Lancet Infect Dis* 5(12):751-62.
- [105] **Williams RE** (1963) Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* 27:56-71.
- [106] **Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C** (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 13(2):255-8.
- [107] **Woodford N** (2005) Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clin Microbiol Infect* 11 Suppl 3:2-21.
- [108] **Wos-Oxley ML, Plumeier I, von Eiff C, Taudien S, Platzer M, Vilchez-Vargas R, Becker K, Pieper DH** (2010) A poke into the diversity and associations within human anterior nares microbial communities. *ISME J* 4(7):839-51.
- [109] **Yamamoto T, Nishiyama A, Takano T, Yabe S, Higuchi W, Razvina O, Shi D** (2010) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. *J Infect Chemother* 16(4):225-54.

-
- [110] **Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR** (2005) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 5(5):275-86.
- [111] **Zhang SX, Drews SJ, Tomassi J, Katz KC** (2007) Comparison of two versions of the IDI-MRSA assay using charcoal swabs for prospective nasal and nonnasal surveillance samples. *J Clin Microbiol* 45(7):2278-80.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
CA	Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
ccr	cassette chromosome recombinase
h	Stunde(n)
i.B.	im Besonderen
KoNS	Koagulase negative Staphylococcus
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
MIC	minimum inhibitory concentration
ml	Milliliter
MR	Methicillin-resistent
MS	Methicillin-sensibel
MR-KoNS	Methicillin-resistenter Koagulase negativer Staphylococcus
MS-KoNS	Methicillin-sensibler Koagulase negativer Staphylococcus
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MSSA	Methicillin-sensibler Staphylococcus aureus
orfX	Open Reading Frame of unknown funktion
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PPV	Prädiktiver Positiver Wert
PNV	Prädiktiver Negativer Wert
PVL	Panton-Valentine Leukocidin
sec.	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCCmec	Staphylococcus Cassette Chromosom mec
U/min	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter

VRSA	Vancomycin-resistenter Staphylococcus aureus
VISA	Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus
z.B.	zum Beispiel

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Verschiedenen <i>SCCmec</i> Elemente mit ihren Varianten nach Grundmann, H et al.[37]	4
Abbildung 2 Kultureller Nachweis von MRSA [3]	10
Abbildung 3 Vereinfachtes Schema des Aufbaus von <i>SCCmec</i> [3]	13
Abbildung 4 BacLite Rapid MRSA Testverfahren	15
Abbildung 5 Anzahl der Keimbesiedlung im Nasenvorhof	26
Abbildung 6 Keimbesiedlung der Patienten aufgeschlüsselt nach Methicillin-Sensibilität	28
Abbildung 7 Boxensplot Alter der Studienteilnehmer	29
Abbildung 8 Anleitung zur Durchführung des Nasenabstrichs in unserer Studie	I
Tabelle 1 Vier Felder Tafel BacLite® Rapid MRSA	25
Tabelle 2 Vier Felder Tafel BD GeneOhm™ MRSA	26
Tabelle 3 Keimanzahl der Patienten	27
Tabelle 4 Erregerbesiedlungen im Patientenkollektiv	27
Tabelle 5 KoNS-Stämme der Studie	II

8 Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. med. K. Becker und Prof. Dr. med. C. von Eiff für die freundliche Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung danken.

Ich möchte auch dem Institutsdirektor Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters für die Möglichkeit danken, das Thema der vorliegenden Arbeit am Institut bearbeiten zu können.

Ebenso möchte ich mich bei meiner wundervollen Frau für ihre Unterstützung und ihrem Verständnis bei schwierigeren Zeiten der Doktorarbeit bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank den Fachkräften des Instituts, i. B. Martina Schulte, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und die Doktorarbeit mit ermöglicht haben.

Meiner Cousine Laura Rzeha danke ich für die grafische Veranschaulichung in dieser Arbeit.¹

Nicht vergessen darf ich meine Familie und meine Freunde, die mich immer unterstützt und vorangetrieben haben oder ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten. Ihr tragt alle einen Teil zu dieser Arbeit bei.

¹ Abbildung 4

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der online Version nicht enthalten.

Anhang

Durchführung von Wattetupferabstrichen zur Untersuchung auf MRSA

Generell werden Wattetupfer für die Abstrichuntersuchungen verwendet. Diese werden erst kurz vor der Untersuchung aus der sterilen Verpackung entnommen.

Es werden zwei Arten von Abstrichtupfer für diese Studie benutzt

3M Transswap mit Flüssigmedium **LILA Kappe**

Duotransswaps mit Gel-Nährmedium **Weisse Kappe aber zwei Tupferköpfe**

Alle anderen Körperabstriche weiterhin mit dem bekannten Abstrichtupfer mit **blauer** Kappe und normalen Einsendeschein.

Durchführung des Nasenabstrichs

- 1) Öffnen des Umschlags „MRSA-Schnelltest“. Den ersten Abstrichtupfer herausnehmen und Nasenabstrich durchführen. Danach den zweiten Umschlag „2. Abstrich“ öffnen und den 2. Abstrich durchführen.
- 2) Rotierendes Abstreichen beider Nasenvorhöfe für jeweils 5 Sekunden (Watteanteil gerade sichtbar) mit demselben Tupfer (siehe Abbildung).
- 3) Hineinstecken des Tupfers in das Transportmedium und Beschriftung der Probe mit Datum und Name. Bei dem 3 M Tupfer Unterhälfte des Transportröhrchen einige Male zusammendrücken, damit das Feuchtmedium die Bakterien schützen kann.
- 4) Beschriftung des **grünen** Einsendescheins „**MRSA - Schnelltest**“ mit Patientenaufkleber und Datum. Ankreuzen, so weit wie bekannt, ob der Patient Nasenspray erhält oder eine der anderen Angaben.
- 5) Unmittelbare Aufbewahrung der Proben in einem Kühlschrank, bis die Abholung erfolgt.



Abnahme Tage
Montag
Dienstag
Mittwoch
Donnerstag

Rückfragen bitte an: Prof. Becker: **55375** (Institut f. Mikrobiologie)
 Prof. v. Eiff: **52353** (Institut f. Mikrobiologie)
 PD Dr. Friedrich: **52317** (Institut f. Hygiene)
 PCR-Abteilung: **55386** (Institut f. Mikrobiologie)

Abbildung 8 Anleitung zur Durchführung des Nasenabstrichs in unserer Studie

Aufteilung der KoNS-Stämme in dieser Studie

Species	MS	MR
S. epidermidis	452	75
S. haemolyticus	12	8
S. schleiferi	2	0
S. capitis	16	0
S. hominis	40	3
S. lugdunensis	21	5
S. warneri	28	3
S. simulanz	1	0
S. caprae	1	0
S. xylosum	2	0
S. equorum	2	0
Summe	577	94

Tabelle 5 KoNS-Stämme der Studie