

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
DIREKTOR: PROF. DR. HANS WOLF
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**SYSTEMATISCHE EVALUIERUNG VON VIER
UNTERSCHIEDLICHEN REAL-TIME-PCR-NACHWEISVERFAHREN
FÜR METHICILLIN-RESISTENTE STAPHYLOCOCCUS AUREUS
(MRSA) IM VERGLEICH ZU MODERNEN KULTURELLEN
NACHWEISVERFAHREN**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinschen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Olga Betcher
geboren in Reichenau/Polen

2009

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
DIREKTOR: PROF. DR. HANS WOLF
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**SYSTEMATISCHE EVALUIERUNG VON VIER
UNTERSCHIEDLICHEN REAL-TIME-PCR-NACHWEISVERFAHREN
FÜR METHICILLIN-RESISTENTE STAPHYLOCOCCUS AUREUS
(MRSA) IM VERGLEICH ZU MODERNEN KULTURELLEN
NACHWEISVERFAHREN**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Olga Betcher
geboren in Reichenau/Polen

2009

Dekan:

Prof. Dr. Weber

1. Berichterstatter:

PD Dr. Udo Reischl

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Helmut Schweikl

Tag der mündlichen Prüfung:

03. Februar 2010

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	8
1.1 Mikrobiologie und Pathogenität des Staphylococcus aureus.....	8
1.2 Resistenzentwicklung.....	10
1.3 Prävalenz und Folgen des MRSA-Anstiegs.....	11
2 Fragestellung.....	13
3 Material und Methode.....	14
3.1 Studiendurchführung.....	14
3.2 Patientenauswahl.....	14
3.3 Der Abstrichsort – die Nase.....	15
3.4 Die Probenentnahme.....	17
3.5 Der Transport.....	18
3.6 Die Verarbeitung.....	18
3.6.1 MRSA-Screening mittels Kultur- und Bouillon-Bebrütung.....	19
3.6.1.1 Materialien.....	19
3.6.1.2 Beimpfen der Blutplatten.....	19
3.6.1.3 Bouillon-Bebrütung.....	19
3.6.1.4 Auswertung der Platten.....	19
3.6.1.5 Auswertung der Bouillon.....	21
3.6.2 MRSA-Screening mittels unterschiedlicher PCR-Verfahren.....	22
3.6.2.1 Allgemeine Grundlagen zur Realtime-PCR.....	22
3.6.2.2 MRSA-Screening mit Hilfe des GeneXperts.....	24
3.6.2.2.1 Material.....	24
3.6.2.2.2 Ablauf.....	25
3.6.2.3 MRSA-Detektion mittels BD GeneOhm™MRSA Test.....	25
3.6.2.3.1 Materialien.....	25
3.6.2.3.2 Vorgehen.....	26
3.6.2.4 LightCycler®MRSA Advance Test.....	28

3.6.2.4.1	Material.....	28
3.6.2.4.2	Instrumente und Software.....	28
3.6.2.4.3	Andere Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	29
3.6.2.4.4	Vorgehensweise.....	29
3.6.2.5	PCR mit dem LightCycler 480.....	30
3.6.2.5.1	Material.....	30
3.6.2.5.2	Geräte	30
3.6.2.5.3	PCR-Protokoll.....	30
4	Ergebnisse.....	32
4.1	Begriffsbestimmung.....	32
4.2	Auswertung der kulturellen Ergebnisse.....	32
4.3	Auswertung der PCR-Ergebnisse.....	34
4.3.1	GeneXpert-Ergebnisse.....	34
4.3.1.1	BD GeneOhm™MRSA Test-Ergebnisse.....	35
4.3.2	LightCycler®MRSA Advance Test-Ergebnisse.....	36
4.3.3	PCR-Ergebnisse aus dem in-house MRSA Protokoll mit dem LC480.....	37
5	Diskussion.....	38
5.1	Ergebnisvergleich.....	38
5.1.1	Kulturnachweis	38
5.1.2	GeneXpert MRSA Test.....	39
5.1.3	BD GeneOhm™MRSA Test.....	41
5.1.4	LightCycler®MRSA Advance Test.....	42
5.1.5	In-House PCR mit dem LightCycler 480.....	43
5.2	Anwenderfreundlichkeit.....	44
5.2.1	Kultureller Nachweis.....	44
5.2.2	GeneXpert MRSA Test.....	45

5.2.3 BD GeneOhm™MRSA Test.....	45
5.2.4 LightCycler®MRSA Advance Test.....	46
5.2.5 PCR mit dem LightCycler 480.....	46
5.3 Summarische Bewertung.....	47
6 Ökonomischer Aspekt.....	47
7 Zusammenfassung.....	50
8 Anhang.....	52
8.1 Literaturverzeichnis.....	52
8.2 Tabellenverzeichnis.....	54
8.3 Abbildungsverzeichnis.....	54
9 Danksagung.....	55
10 Lebenslauf.....	56
11 Erklärung.....	57

1 Einleitung

1.1 Mikrobiologie und Pathogenität des *Staphylococcus aureus*

In den letzten Jahrzehnten entwickelte sich der MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) als der wichtigste „multi-resistente“ Erreger weltweit, der am häufigsten zu nosokomialen Infektionen führt.

Staphylokokken sind runde bis ovale unbewegliche Bakterien und gehören zu den gram-positiven Kokken, die aufgrund ihrer unregelmäßigen Teilungsebene in Kokkenhaufen oder kurzen Ketten vorgefunden werden. Humanpathogen am bedeutsamsten ist die Art *Staphylococcus aureus*, die aufgrund ihrer speziellen Eigenschaft, Plasma zu koagulieren von den übrigen Koagulase-negativen Staphylokokken unterschieden wird. Das Wachstums-Optimum liegt zwischen 30°C und 37°C wobei sie relativ pH- und trockenresistent sind.

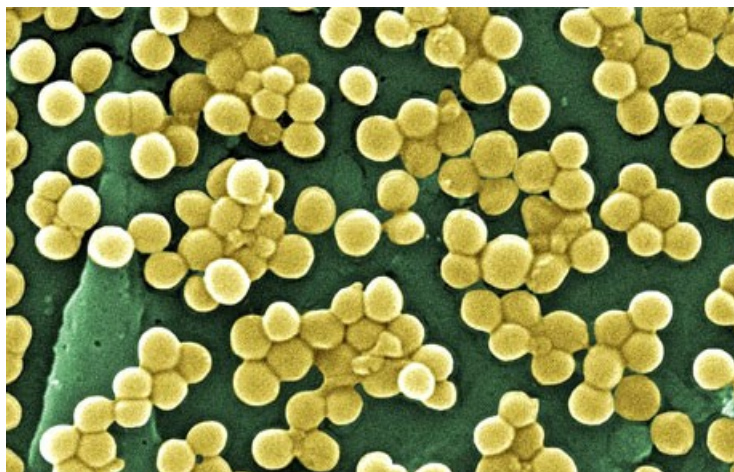


Abbildung 1: REM-Aufnahme von MRSA bei 9560facher Vergrößerung

Staphylococcus aureus ist ein normaler Bestandteil der Hautflora von Mensch und Tier, der sich hauptsächlich an salzigen Standorten wie der nasalen Schleimhaut, der Perianalregion, der Axilla oder einer Wundregion finden lässt, während die gesunde Haut damit nur passager besiedelt ist. In der Normalbevölkerung sind etwa 15-20% permanent, 50-70% passager und nur 15-20% nicht nasal mit *S. aureus* besiedelt. Die unterschiedlichen Besiedlungsmuster hängen von einer Reihe individueller Faktoren wie Alter, Geschlecht, Rasse, genetischen Faktoren (HLA-Muster), Grunderkrankungen (Diabetes mellitus, chronische Ekzeme, atopische Diathese) oder Hospitalisierung ab.¹

Während die Besiedlung an sich keinen primären Krankheitswert besitzt, leiden

immunsupprimierte Träger an einem deutlich erhöhten Risiko für staphylogene Hauterkrankungen oder Wundinfektionen.

Durch die Anlagerung zahlreicher Proteine kann der *S. aureus* IgG binden, Polysaccharid-Kapseln bilden oder sich an Kollagen binden. Durch diese Eigenschaften kann jener Erreger tiefe Wund- und Weichteilinfektionen verursachen. So kommen folliculäre Infektionen oder eine Impetigo vor. In seltenen Fällen kann es aber auch zu ausgedehnten Phlegmonen oder zu der gefürchteten nekrotisierenden Fasciitis kommen.²



Abbildung 2: Ein durch MRSA verursachter kutaner Abszess

Diese Krankheitsbilder können entweder einen infektiösen oder einen toxischen Charakter haben, wie es die unten stehende Tabelle auflistet:

<i>Gruppe 1</i>	<i>Gruppe 2</i>
<i>Eitrige Infektionen</i>	<i>Toxinbedingte Erkrankungen</i>
<i>Haut- und Weichteilinfektionen, Impetigo, Abszesse</i>	<i>“Toxic-shock“-Syndrom</i>
<i>Osteomyelitis</i>	<i>Bullöse Impetigo „Staphylococcal Scaled Skin“-Syndrom</i>
<i>Pneumonie</i>	<i>Rezidivierende Abszesse</i>
<i>Sepsis</i>	<i>Lebensmittelvergiftung</i>
<i>Fremdkörperassoziierte Infektionen</i>	

Tab.1: Durch *S. aureus* und MRSA verursachte Krankheitsbilder³

1.2 Resistenzentwicklung

Das Standardmedikament gegen staphylogene Infektionen war seit Einführung der Antibiotika das Penicillin. Doch durch die unkritische und häufig falsche Anwendung von Breitbandantibiotika stieg der Selektionsdruck und erste Resistenzen entwickelten sich. Der Resistenzmechanismus von *Staphylococcus aureus* beruht auf der Bildung des so genannten Penicillinbindungsproteins PBP 2a. Es senkt deutlich die Bindungsaffinität der β -Laktamring-tragenden Antibiotika, wie der Penicilline und Cephalosporine, so dass die Hemmung der Zellwandsynthese des *S. aureus* inhibiert wird. Man versuchte dem mit einem halbsynthetischen β -Laktamase-stabilen Antibiotika entgegen zu wirken, dem Methicillin. Doch Anfang der sechziger Jahre wurde das erste Mal das Auftreten von Methicillin-resistenten Stämmen, genannt MRSA, beschrieben. Seitdem hat man immer wieder Versuche gestartet die resistenten Stämme mit neuen Substanzklassen einzudämmen. Dabei kam es schon nach durchschnittlich vier Jahren zu neuen Mutanten-Stämmen, so dass heute oft MRSA mit zusätzlichen Resistenzen gegen Makrolide, Lincosamide, Tetracycline, Fluorochinolone, Sulfonamide sowie Aminoglykoside vorkommen. Daher spricht man heute auch vom „multi-resistenten *S. aureus*“.

Dieser rasch fortschreitende Prozess konnte bisher nur durch das Allheilmittel Vancomycin verlangsamt werden, wobei auch schon hier im Jahre 2002 Isolate in der USA aufgetaucht sind, die diese Resistenz aufweisen (VRSA)(Vancomycin-resistente MRSA).³

Würde es zu einer Verbreitung dieser VISA (Vancomycin-intermediär-empfindlichen *S. aureus*) oder VRSA kommen, würden die Therapiemöglichkeiten bei solchen Infektionen weiter dramatisch eingeschränkt werden.⁴

Die unten stehende Tabelle zeigt die Häufigkeit und den Anstieg der Resistenzen gegen unterschiedliche Antibiotikaklassen von 2000-2006 auf:

Antibiotika	2000 (n=3.091)	2002 (n= 2.238)	2003 (n=2.234)	2004 (n=3.071)	2005 (n=2.610)	2006 (n= 2.196)
Ciprofloxacin	95,3%	97,18 %	96,41 %	93,8%	93,7 %	93,8 %
Erythromycin	72,8%	72,3 %	71,21 %	71,7%	70,9%	72,5 %
Clindamycin	64,3%	67,7 %	67,77 %	66,4%	66,1 %	65,4%
Gentamicin	41,3%	23,95 %	23,46 %	16,9%	11,8%	13,3 %
Oxytetracyclin	9,2%	4,58 %	5,42%	6,2%	6,4 %	7,4%
Trimethoprim/ Sulfonamid	9,7%	3,61 %	3,36 %	3,6%	2,8 %	3,1%
Rifampicin	4,1%	1,87 %	2,55 %	2,0%	1,7 %	2,5 %
Fusidinsäure	3,4%	2,44 %	3,28 %	4,6%	4,8 %	6,4%
Mupirocin	2,6%	1,65 %	1,25 %	2,9%	1,4 %	2,6%
Quinupristin/ Dalfopristin	0,8%	0,05 %	0	0	0	0
Vancomycin	0	0	0	0	0	0
Teicoplanin	0	0	0,22%	0,1%	0	0
Linezolid	0	0	0	0	0	0,04%
Fosfomycin	2,8%	2,7 %	2,4%	4,1%	1,2%	3,3%

Tab.2: Häufigkeit der Resistenz gegenüber weiteren Antibiotika bei MRSA aus Krankenhausinfektionen in Deutschland 2000–2006, basierend auf Einsendungen an das NRZ ⁵

1.3 Prävalenz und Folgen des MRSA-Anstiegs

Obwohl bereits Präventionsstrategien durchgeführt werden, ist in den vergangenen Jahren in Deutschland ein Anstieg der MRSA-Rate von zwei Prozent auf rund 25 Prozent zu vermerken.⁶ Diese Zahlen machen deutlich, dass eine Intensivierung und Verbesserung der Maßnahmen erforderlich ist, um den Erreger in Griff zu bekommen und die nosokomialen Infektionen einzuschränken. In den Niederlanden hält sich der Anteil durch konsequente und koordinierte Präventionsmaßnahmen seit Jahren stabil auf unter einem Prozent.⁷ In Krankenhäusern und anderen sanitären Einrichtungen in denen Menschen gepflegt werden, ist zudem eine deutliche Erhöhung der Prävalenz von HA-MRSA (health care-associated MRSA) erkennbar, die zu erschreckender Morbidität und zu immer weiter steigenden Kosten für das Gesundheitswesen führt.⁸ Durch die herabgesetzte Immunabwehr während der Besiedlung mit MRSA kommt es bei infizierten Patienten zu einer schlechteren Prognose der Ausheilung verbunden mit einem verlängerten Krankenhausaufenthalt, bis hin zur erhöhten Mortalität bei eintretender Bakteriämie. Die Behandlung der Betroffenen mit wirkungsvollen Antibiotika ist mit erhöhten Nebenwirkungen verbunden.⁹ Die nötige Isolation kostet das Personal viel Zeit durch das Umziehen, viel Raum durch die Isolation der Patienten in Einzelzimmern, und hohe Kosten durch häufige Wiederholung klinischer Nachweisverfahren. In Praxen, Pflegestationen und Krankenhäusern wird der MRSA zwischen Patienten und Personal durch direkten

(Schmierinfektion), indirekten Kontakt (kontaminierte Oberflächen und Wäsche) oder durch Autoinokulation (endogene Infektion) aus dem Nasenrachenraum übertragen.¹⁰

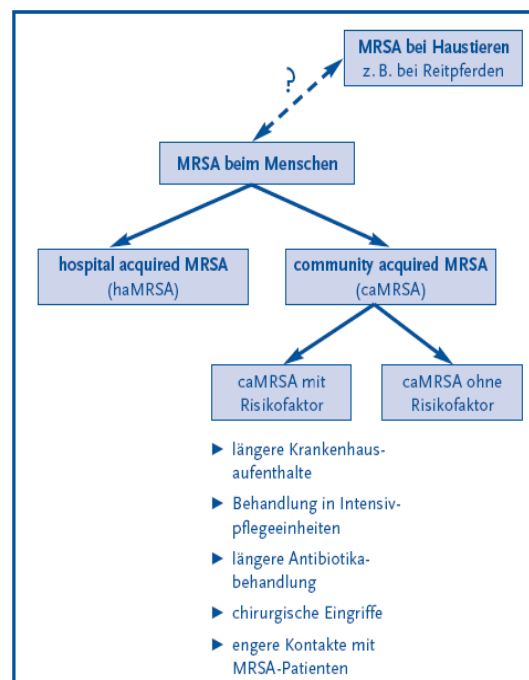


Abbildung 3: Begriffsbestimmungen zu MRSA⁵

Doch in der Bevölkerung macht sich seit den 1980er Jahren der CA-MRSA (community-acquired) breit. Dabei weisen die betroffenen Patienten weder einen Aufenthalt in sanitären Anlagen, noch einen Kontakt zu infizierten Patienten auf. Der Keim wird hauptsächlich über direkten Kontakt übertragen und hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Interessanter Weise trifft man ihn sowohl bei Kindern als auch Erwachsenen aus unterschiedlichsten Populationen an, die in einem engen körperlichen Kontakt standen. So fand man ihn bereits bei Ureinwohner Australiens, bei Wehrpflichtigen, bei Teamsportlern, Gefangenen oder Drogenabhängigen vor.^{11,12} Der hauptsächliche Unterschied zu herkömmlichen *S. aureus*-Stämmen ist eine bisher noch nicht gesehene Kombination aus Pathogenitäts- und Resistenzfaktoren.¹³ Im Besonderen ist der Besitz eines Panton-Valentine-Leukozidins zu erwähnen, welches ein porenbildendes Toxin darstellt und Granulozyten und Makrophagen abtötet. Klinisch zeigt sich das in tiefen rezidivierenden Weichgewebsinfektionen, die typischerweise ohne sichtbare Eintrittspforte auftreten.¹⁴ In seltenen Fällen wurde er aber auch schon in Zusammenhang mit ernsthaften Lungenentzündungen gebracht.¹⁵

2 Fragestellung

Bei dieser besorgniserregenden Dynamik der Verbreitung von MRSA müssen auf jeder Ebene Maßnahmen ergriffen werden, um in Hinblick auf die knapper werdenden finanziellen Ressourcen im Gesundheitswesen eine Lösung zu finden, die die MRSA Prävalenz zumindest eindämmt, wenn nicht sogar stoppt, bevor es zu einer Ausbreitung von VRSA oder cMRSA kommt. Die Niederlande und einige skandinavischen Länder haben erfolgreich bewiesen, dass durch strikte und routinemäßige Screenings bei Neuaufnahme, strenge Isolierungsmaßnahmen bis zum endgültigen mikrobiologischen Nachweis, Einhaltung von Hygienemaßnahmen und der damit verbundenen Bereitstellung finanzieller und personeller Ressourcen, die MRSA-Prävalenz bis unter einen Prozent sinken kann.¹⁶

Folglich muss es Ziel sein, die weitere Ausbreitung von MRSA zu verhindern. Maßnahmen hierzu sind vor allem Screenings auf MRSA Trägerschaft, Verhütung der Verbreitung durch entsprechende Hygienemaßnahmen und rationaler Einsatz von Antibiotika, um eine weitere Selektion bzw. Evolution zu verhindern. Um diese Maßnahmen jedoch zeitnah umsetzen zu können, ist eine rasche Identifikation von betroffenen Patienten notwendig. Dazu werden immer weitere, neuere und schnellere Nachweisverfahren entwickelt. Mittlerweile gibt es ein breites Spektrum an kulturellen und PCR-basierten Konzepten, die von den Firmen als die besten und schnellsten angepriesen werden. Doch auch diese Aussagen müssen von den mikrobiologischen Instituten kritisch und vorsichtig gewertet werden. Daher ist es wichtig sich mit den Geräten auseinander zu setzen, die analytischen Ergebnisse, Spezifitäten und Sensitivitäten, PPV und NPV (positive und negative prädiktive Werte), die Vor-, und Nachteile zu ermitteln, und den sinnvollen Einsatzbereich zu definieren. Welcher Zeitaufwand steht hinter den einzelnen Verfahren, wie hoch sind die entstehenden Kosten, und welchen Nutzen kann man aus den Neuentwicklungen ziehen?

In der folgenden Studie wurden vier aktuelle PCR-gestützte Nachweisverfahren mit der konventionellen Kulturdiagnostik auf Sensitivität, Spezifität, Zeitaufwand, Kosteneffizienz und Anwendungsfreundlichkeit verglichen.

3 Material und Methode

3.1 Studiendurchführung

Der Zeitrahmen der Studie wurde auf acht Wochen festgelegt, wobei an zwei Standorten in Deutschland insgesamt 100 Proben gesammelt, und die Ergebnisse anschließend zusammengefasst wurden. In diesem Zeitraum wurden am Universitätsklinikum Regensburg wie auch am Krankenhaus Barmherzige Brüder bei Risikopatienten für MRSA Nasenabstriche entnommen. Diese Entnahme der Abstriche fand unter Ethikvotum, nach Absprache mit dem Stationspersonal und mit schriftlich dokumentierter Einwilligung des Patienten mit Hilfe von zwei Doppeltupfern (BBL™ Culture Double Swab) statt.

3.2 Patientenauswahl

Dem Studienprotokoll nach sollten Risikopatienten abgestrichen werden, die den aktuellen Empfehlungen des Robert-Koch-Instituts entsprachen:

- Patienten mit bekannter MRSA-Anamnese
- jene Patienten, die aus Regionen bzw. Einrichtungen mit bekannter hoher MRSA-Prävalenz verlegt wurden (z.B. Pflege-, oder Seniorenheimen, Intensivstationen)
- Kontaktpersonen von MRSA-Patienten
- pflegebedürftige Patienten
- Patienten mit längerem Krankenhausaufenthalt
- Patienten mit liegenden Kathetern, Dialysepflichtigkeit, Hautulzera, chronischen Wunden und Brandverletzungen.

Ausgeschlossen wurden Patienten, die:

- stillen oder schwanger waren
- unter 18 Jahre alt waren
- an dem Tag der Abnahme bzw. bis zu 7 Tage vorher eine systemische oder topische MRSA-wirksame Antibiotikagabe (wie z.B. Mupirocin, Rifampicin oder Clindamycin) erhalten haben

- an der aktuellen Studie schon einmal teilgenommen haben.

Das Regensburger Universitätsklinikum besitzt ein MRSA-Screening-Programm, welches krankenhausesweit die MRSA-Fälle aufnimmt und verzeichnet. Bei der stationären Aufnahme von Patienten wird ein Abstrich von Nase, Rachen und Wunde durchgeführt. Man konzentriert sich dabei auf die Risikogruppen und Patienten mit elektiven Operationen. Somit kann jederzeit bei erneuter Aufnahme im Informationssystem die Historie des Patienten aufgerufen und nötige Maßnahmen sofort ergriffen werden.

Mögliche Strategien	Universitätsklinikum Regensburg	Medizinische Hochschule Hannover
Konzentration auf Risikogruppen oder generelles Aufnahme-Screening?	Risikopatienten einschließlich Patienten mit elektiven Operationen	Alle Patienten der Intensivstationen und chirurgischen Abteilungen
Nur Nasen-Screening oder Berücksichtigung weiterer Abstrichorte?	Nase/Rachen und Wunden/Hautläsionen	Nase/Rachen und Wunden/Hautläsionen
Nur Screening bei der stationären Aufnahme oder wöchentliche Wiederholungen?	Nur Aufnahme-Screening	Nur Aufnahme-Screening
Vorsorgliche Isolierung der Patienten bis zum Vorliegen eines negativen Befundes oder erst bei MRSA-Nachweis?	Vorsorgliche Isolierung bis zum Vorliegen des negativen MRSA-Befundes	Keine vorsorgliche Isolierung

Tab. 3: Beispiele für Strategien des MRSA-Screenings am Universitätsklinikum Regensburg und der Medizinischen Hochschule Hannover (2005)⁷

Je nach der lokalen MRSA-Prävalenz kann es jedoch sinnvoll sein, neben den oben genannten Risikogruppen auch weitere Patienten mit in das Screening einzubeziehen. Jede Institution sollte für sich entscheiden welche Patientenauswahl sie trifft. Aktuelle Studien haben allerdings gezeigt, dass ein großer Anteil an MRSA-Patienten bereits zum Zeitpunkt der Aufnahme besiedelt war und sich nicht mit dem Erreger im Krankenhaus infiziert hat. Werden nur Patienten aus Infektionsprozessen gescreent, bleiben 38-77% aller Träger unentdeckt und können auf der Station zu einer Übertragung des Erregers führen.¹⁰

3.3 Der Abstrichsort – die Nase

Aufgrund der speziellen physiologischen Bedingungen hält sich der *S. aureus* bei besiedelten Patienten vorwiegend im feuchten und salzigen Milieu der Nasenschleimhaut auf. Daher werden für Screening-Untersuchungen trockene oder befeuchtet Tupfer für einen Nasenabstrich verwendet, da sich diese leicht und ohne große Beeinträchtigung des Patienten gewinnen lassen. Für die anschließend Weiterverarbeitung und DNA-Präparation haben sich trockene

Tupfer oder Tupfer mit einer speziellen saugfähigen, aber inerten Oberfläche bewährt. Auch in dieser Studie sind diese speziellen Tupfer der Fa. Copan verwendet worden.



Abbildung 3: Tupfer für Nasenabstrich (Fa. Copan)

Nachweislich ist der Nasenabstrich der kostengünstigste und sensitivste Einzel-Nachweisort, und ist zudem für den Patienten am wenigsten belastend.

Besonders bei Patienten mit offenen Wunden lässt sich durch Kombination mit einem zweiten Abstrichsort wie z. B. der Wunde oder dem Perineum die Sensitivität weiter erhöhen, wobei dadurch auch die Kosten für die Diagnostik steigen.¹⁷ Daher muss der Umfang und die Art des einzusendenden Abstrichmaterials stets nach sorgfältiger Abwägung von medizinischen und ökonomischen Gesichtspunkten getroffen werden.

Eine auf den Tag genau abgestimmte, wöchentliche Wiederholung des Abstrichs zur Kontrolle ist empfehlenswert, aus organisatorischen Gründen aber oftmals nicht möglich. Selten können die Patienten bis zum Ergebnis der Untersuchungen vorübergehend isoliert werden- meistens ist es an den Kliniken logistisch nicht durchführbar.

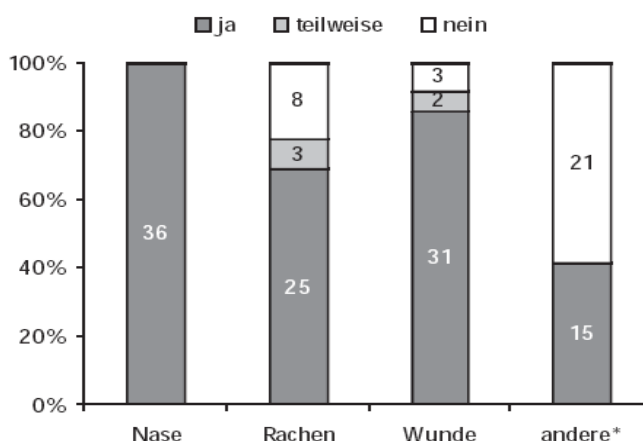


Abbildung 4: Abstrichorte für das MRSA-Screening an deutschen Universitätskliniken im Mai 2005 (n=36)

*Eintrittsstelle von Kathetern, Sonden und Drainagen, Anus, Perineum, Leiste, Stirn-Haargrenze, Axillen und Hände⁷

Abstrichort	Durchschnittliche Sensitivität (%)		
	Kunori et al. ¹²	Universität Heidelberg	Charité Berlin
Nase	64,2	53,4	79,9
Perineum	56,2	39,0	31,6
Haut	38,0	–	81,8
Hautläsion/Wunde	–	68,1	–
Leiste	–	44,1	34,0
Axilla	25,0	–	–
Urin	22,0	–	–
Stuhl	18,7	–	–
Rachen	14,7	36,0	45,0
Kombinationen			
Nase + Hautläsion/Wunde	100,0	87,2	–
Nase + Perineum	93,4	67,0	–
Nase + Rachen	85,6	61,8	86,7
Nase, Rachen, Perineum	98,3	71,0	–
Nase, Rachen, Hautläsion/Wunde	–	91,5	–

Tab. 4: Sensitivität für den MRSA-Nachweis nach Abstrichsort⁷

3.4 Die Probenentnahme

Vor Beginn der Studie musste bei der Ethikkommission ein „Antrag zur Beurteilung ethischer und rechtlicher Fragen eines medizinischen Forschungsvorhabens am Menschen“ eingereicht werden. Sobald das Procedere von der Kommission bewilligt wurde, konnte mit dem Sammeln der Proben begonnen werden. Innerhalb von einem Zeitraum von zwei Monaten ist die Sammlung der Proben durchgeführt worden. Auf bestimmten Stationen fand man eine erhöhte Anzahl von Infizierten. Die Patienten auf den chirurgischen Abteilungen, der Inneren Medizin und v.a. den Intensivstationen waren häufiger betroffen, wie es auch aus deutschlandweiten Untersuchungen hervorgeht:

Infektion	Gesamt	Innere Medizin	Intensivstation	Chirurgie	Neurologie	Dermatologie	Orthopädie	Urologie	Gynäkologie	„ambulant“	andere
Harnwegsinfektion	130	40 13,2%	2 0,8%	7 2,0%	18 29,5%	1 6,7%	12 15,8%	13 29,5%	0 0,0%	19 14,4%	18 2,7%
Pneumonie	260	66 21,7%	131 51,5%	9 2,6%	10 16,4%	0 0,0%	4 5,3%	4 9,1%	0 0,0%	2 1,5%	22 13,1%
Sepsis	141	57 18,8%	39 15,5%	20 5,8%	3 4,9%	0 0,0%	6 7,9%	3 6,8%	0 0,0%	1 0,8%	12 10,0%
Wundinfektion	847	141 46,4%	80 31,7%	307 36,2%	30 0,7%	14 1,7%	54 6,4%	24 2,8%	3 0,4%	110 13%	83 12,9%
Gesamt	1.378	304 22,1%	252 18,3%	343 24,9%	61 0,6%	15 1,1%	76 5,5%	44 3,2%	3 0,2%	132 9,6%	132 9,8%

Tab. 5: Auftreten der häufigsten Infektionen mit MRSA in verschiedenen klinischen Disziplinen, basierend auf Einsendung an das NRZ, 2005/2006

Stets musste auf einen hygienischen und umsichtigen Umgang mit jenen gefährdeten oder bekannt positiven Patienten geachtet werden. Zum einen ist man immer ausgestattet mit Handschuhen und Mundschutz an den Patienten getreten. Bei verdächtigen oder bekannten MRSA-Trägern, die bereits isoliert waren, wurden weitere Vorsichtsmaßnahmen getroffen: Vor den Zimmern befanden sich sterilisierte Kleiderwägen mit Kitteln. Außerdem hat man sich zusätzlich eine Kopfhaube, den Mundschutz und Handschuhe angezogen. Die Patienten wurden vor der Abnahme über die Studie aufgeklärt und es wurde jeweils eine Einverständniserklärung eingeholt. Die speziellen Tupfer waren zwar trocken, besaßen aber eine saugfähige und inerte Oberfläche. Jeder Doppeltupfer wurde etwa 1,3cm tief sowohl ins rechte als auch ins linke Nasenloch eingeführt und ungefähr fünf Mal an der vorderen Nasenwand entlang gefahren. Danach wurde der Tupfer sofort in das dazugehörige Aufbewahrungsgefäß überführt. Mit einem zweiten Doppeltupfer wiederholte man das Procedere. Die Gefäße wurden als erster und zweiter Abnahmetupfer gekennzeichnet und mit einer eindeutigen ID (REG_1-50) versehen. Der Patientename, wie auch seine ID, das Geburtsdatum, die Station und die ursprüngliche Krankheit wurden mit dem Abnahmedatum in einer Liste aufgenommen. Vor Verlassen des Zimmers hat man sich der Schutzkleidung entledigt, und sowohl die Hände als auch die Aufbewahrungsgefäße und den Kugelschreiber desinfiziert.

3.5 Der Transport

Sobald eine gewisse Anzahl an Tupfern gesammelt war, wurden diese in das Eingangslabor der Bakteriologie im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg gebracht. Dort wurden jene Abstriche abgegeben, die als zweites am Patienten entnommen wurden.

Die Tupfer sollten bei einer Temperatur von 2-25°C transportiert werden. Bei Raumtemperatur (15 °C – 25 °C) sind die Proben bis zu 4 Tagen bearbeitbar. Im Kühlschrank aufbewahrt kann man die Tupfer noch bis zu 5 Tagen verwenden.

3.6 Die Verarbeitung

Spätestens nach 24h wurden die Tupfer verarbeitet. Die als erstes am Patienten angewandten Tupfer wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene weiterverarbeitet. Ein Tupfer wurde für den LightCycler® MRSA Advanced Test, der andere zum Vergleich für den BD GeneOhm™ MRSA Test benutzt.

In der Abteilung für Bakteriologie wurde der zweite Doppeltupfer im Eingangslabor

abgegeben, wovon einer für den kulturellen Nachweis benutzt wurde, und der andere Tupfer mit einem Real-time PCR-gestützten Testsystem, dem CepheidGeneExpertMRSA Test geprüft wurde.

3.6.1 MRSA-Screening mittels Kultur- und Bouillon-Bebrütung

3.6.1.1 Materialien

Nährmedien:

Blutagar: Columbia Agar Base, VWR 1.10455

Bouillon: NaCl-haltiges Nährmedium

Antibiotika-Plättchen:

Ceftizoxime 5mg

Sonstiges:

Drahtöse zum Ausstreichen, Neolap Nr.:333100030

Pinzette, Roth Nr.:26891

Gasbrenner, Roth Nr.: H 703. 1

3.6.1.2 Beimpfen der Blutplatten

Die zu benutzenden Blutagarplatten wurden entsprechend der ID und dem Abnahmedatum beschriftet. Das angewandte Kulturverfahren unterscheidet sich nur marginal von denen in der Routinediagnostik des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Bakteriologie am Klinikum Regensburg: Mit dem ersten Tupfer wurde vorerst eine Blutagarplatte und eine Blutagarplatte mit Ceftizoxime anhand des Drei-Ösen-Abstrichs beimpft. Diese wurden über Nacht im Brutschrank aufbewahrt und am nächsten Tag betrachtet.

3.6.1.3 Bouillon-Bebrütung

Außerdem wurde der gleiche Tupfer noch in einer 0,6% NaCl-haltigen Nährbouillon ausgewrungen, welche schüttelnd bebrütet und am nächsten Tag sowohl vor-, als auch nachmittags betrachtet wurde. Die salzhaltige Lösung soll als Selektivmedium für das Staphylokokken-Wachstum dienen.

3.6.1.4 Auswertung der Platten

Die Blutagarplatte enthält kein Selektivmedium, so dass darauf viele Bakterienspezies wachsen können. Nach 24h wurden die Platten zum ersten Mal ausgewertet. Dabei wurde das Wachstum

von *S. aureus*, gram-negativen Stäbchen, Enterokokken und sonstige Auffälligkeiten notiert. Die Mengenangaben wurde wie folgt festgelegt:- kein Wachstum, +mäßiges Wachstum, ++ viel Wachstum, +++ sehr viel Wachstum.



Abbildung 5: *Staphylococcus aureus* auf Blutplatte

Wurden STAU (*S. aureus*)-Kolonien erkannt, wurden spezielle biochemische und biophysikalische Reaktionen zum STAU-Ausschluss bzw. Beweis durchgeführt. Gelbliche und weiße Kolonien wurden auf β -Hämolyse nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung überprüft. Der Nachweis der Hämolyse ist ein Indiz für STAU. Außerdem deutet eine positive Katalase-Reaktion auf gram-positive Staphylokokken hin. Zusätzlich auf die Anzuchtsblutplatte aufgelegte Antibiotika-Plättchen, hier Aztreonam, (ATM) welches gram-negative Keime im Wachstum hemmt, jedoch gram-positive Keime ungehindert wachsen lässt, erleichtert das Isolieren verdächtiger Kolonien. Zusätzlich wurde auf die Anzuchtsplatte auch ein Cefizoxime Plättchen aufgelegt, das bei Resistenz ein guter Indikator für MRSA ist. Jenes semisynthetische Breitspektrum-antibiotikum aus der Substanzklasse der β -Laktamaseresistenten Cephalosporine hemmt das Wachstum gram-negativer Bakterien. Bei sichtbarem Wachstum von STAU wurde auf die Platte noch ein Cefoxicin-Plättchen positioniert und die Größe des entstehenden Hemmhofes bestimmt. Cefoxicin gilt als Standardmedikation bei gram-positiven Infektionen und ist ebenfalls β -Laktamaseresistent. Wenn der Hemmhof 26-27 mm groß war, wurde zusätzlich

eine Resistenztestung mit PBP2a durchgeführt, um sicher zu gehen, dass es sich nicht nur um einen STAU, sondern um einen MRSA handelte.

Verdächtige Kolonien wurden durch einen Latexagglutinationstest (Staphaurex) näher spezifiziert. Hier löst der für STAU typische Clumping Faktor das zellwandständige Protein A eine Gerinnungsreaktion mit dem im Kit enthaltenen Fibrinogen aus. Jenes ist an Latexpartikel gebunden, um es besser sichtbar zu machen.

STAU-positive Kolonien wurden durch Überimpfen auf eine „Müller-Hinton-Oxa-Platte“, welche auf der einen Hälfte NaCl-haltig und auf der anderen Hälfte mit Oxacillin versetzt war, auf Oxacillin-Resistenz überprüft. Nach 24 stündiger Bebrütung war MRSA-Wachstum auf beiden Hälften nachweisbar, da jene Keime resistent gegen Oxacillin sind.

Parallel hierzu wurde ein Standard Antibiogramm mittels Agardiffusion erstellt. Hierbei wird auf Müller-Hinton-Platten, die mit unterschiedlichen Antibiotika-Plättchen versehen sind, ein Agar-Diffusionstest durchgeführt. Nach Bebrütung bei 36°C über Nacht können am nächsten Morgen die einzelnen Hemmhöfe um die Plättchen ausgemessen werden und so die Resistenzen als E= Empfindlich, I= Intermediär und R= Resistent ausgewertet werden.



Abbildung 6: Müller-Hinton Platte mit *S. aureus*, welche eine eindeutigen Resistenz auf Cefoxitin und Oxacillin aufweist

3.6.1.5 Auswertung der Bouillon

Das NaCl-haltige Milieu dient als Selektivmedium für gram-positive Staphylokokken. Wurde im Laufe der Auswertungen die Bouillon trüb, konnte von einem staphylogenem Wachstum

ausgegangen werden. Dennoch war bis dato noch nicht bekannt, und auch nicht einzig mit dieser Methode feststellbar, ob es sich auch um einen MRSA handelte. Dazu wären weitere Tests nötig. Diese Bouillon-Bebrütung wurde als experimenteller Ansatz parallel zur Studie durchgeführt, um die hauseigene Neuentwicklung zu testen. Die Ergebnisse flossen aber nicht in die Studienbewertung ein.

3.6.2 MRSA-Screening mittels unterschiedlicher PCR-Verfahren

3.6.2.1 Allgemeine Grundlagen zur Realtime-PCR

Ein weitaus schnelleres und neueres Verfahren zum MRSA-Nachweis ist das PCR(Polymerase-Chain-Reaction)-Verfahren. Die PCR-Diagnostik ist eine *in vitro* Technik, die die Fähigkeiten der Natur zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen nachahmt. Aus dem Probenmaterial wird zuerst mit aufwendigen Lyseverfahren die gesamte DNA isoliert und die unnötigen Bakterienbestandteile abgelöst. In einem Reaktionsreagenz befinden sich u.a. die 4 Nukleotide als Bausteine der Nukleinsäuresynthese, Primer, Sonden und eine hitzestabile Polymerase. Die isolierte DNA und das PCR-Reaktionsgemisch werden miteinander vermischt und die Polymerase-Kettenreaktion wird gestartet. Damit eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA stattfinden kann, muss das Reaktionsgefäß vorerst auf über 90°C erhitzt werden. Dadurch werden die Wasserstoffbrücken, die die Basen miteinander verbinden, gelöst. Anschließend erfolgt eine Abkühlung auf 55°C, so dass die komplementären Primer an das entsprechende DNA-Segment andocken können. Es werden zwei Primer verwendet, um den Anfang und das Ende der Zielsequenz zu begrenzen. Dieser Vorgang wird Hybridisierung bzw. Annealing genannt. Durch erneuten Temperaturanstieg wird das Enzym, die *Taq* DNA-Polymerase, aktiviert und es kommt zu einer Ergänzung und Verlängerung des Einzelstrangs mit komplementären Nukleotiden zum Doppelstrang. Dieser 3-Schritt-Zyklus (Denaturierung, Annealing und Extension) dauert zwei bis drei Minuten und kann viele Male wiederholt werden. Ein weitere Vorteil ist, dass nur eine sehr geringe Ausgangskonzentration an DNA ausreicht, um einen Zielorganismus nachzuweisen. Denn schon nach 20 Zyklen hat man eine Millionen an DNA-Abschnitts-Kopien, die von Primern, die mit fluoreszierenden Sonden markiert sind, begrenzt werden. Durch die Messung der Fluoreszenzintensität im Reaktionsgefäß kann der Vorgang in Echtzeit verfolgt werden und wird deshalb als Real-Time-PCR bezeichnet.¹⁸

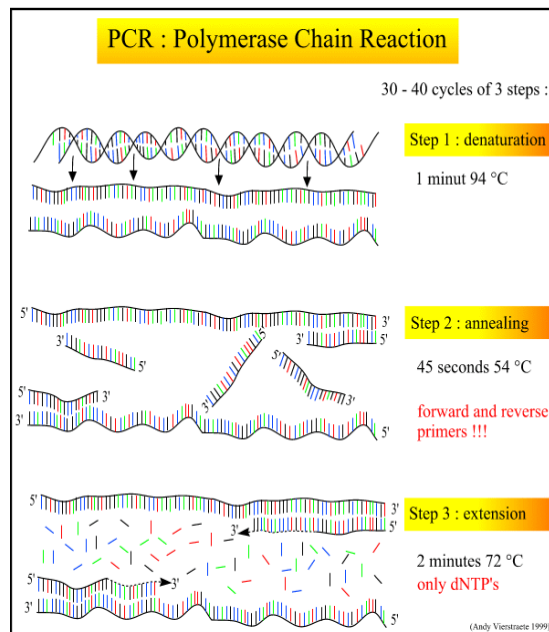


Abbildung 7: Ablauf der PCR

Aufgrund der hohen analytischen Sensitivität und Spezifität dieser PCR-gestützten Nachweisverfahren wurde versucht kommerzielle und selbst entwickelte Testsysteme zu finden, mit denen ein Direktnachweis von MRSA aus klinischem Probenmaterial möglich ist. Es haben sich mittlerweile unterschiedliche Testkonzepte entwickelt, die hier kurz dargestellt werden sollen: Das klassische MRSA-Protokoll erfasste vorerst nur das *mecA*-Gen als Marker, dessen Genprodukt (PBP 2a) sowohl in Koagulase-negativen Staphylokokken (wie z.B. *S. epidermidis* oder *S. haemolyticus*), als auch in *S. aureus* für die phänotypische Ausprägung einer Methicillin-Resistenz verantwortlich ist. Da eine solche Mischkolonisation der Abstrichorte durchaus bei vielen Patienten vorkommt, würden bei diesen PCR-Verfahren nach Bakterienlyse genetisches Material von *S. aureus*- Organismen und das *mecA*-Gen aus den Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokken nebeneinander vorkommen. Das positive Ergebnisse für *S. aureus* und für *mecA*-Gen würde fälschlicherweise auf MRSA-Vorliegen hindeuten.⁷ Der entscheidene Durchbruch für den Direktnachweis von MRSA unter Verwendung mehrerer Primersequenzen wurde erst im Jahre 2001 durch die Gruppe Huletsky et al. geschafft. Das ausschlaggebende Sequenzelement ist die SCCmec-Kassette (Staphylococcal Cassette Chromosome) welche neben einigen Virulenzfaktoren und Genregulationselementen auch das *mecA*-Gen beinhaltet. Sie liegt immer zwischen dem *S. aureus*-Genom und einer Sequenz, genannt *orfX*, welche anhand von Primern abgesteckt werden kann. Derzeit sind bereits sechs verschiedene Kassetten bekannt, die bei einem PCR-Lauf möglichst breit mit einer ausgewählten Mischung an Primern abgedeckt werden müssen. Die zuvor genannten Probleme

der Identifizierung bei Mischbesiedlung entfallen mit diesem innovativem System. Selbst bei Mischkolonisation mit Koagulase-negativen Staphylokokken (KoNS) wird nur dann ein positives Ergebnis angezeigt, wenn in der gesamten Nukleinsäure-Präparation des Untersuchungsmaterials auch *S. aureus*-Genom mit integrierter SCCmec-Kassette (=MRSA) gefunden wird. Die Evaluationdaten dieser Verfahren zeigen in internationalen Studien durchgehende Sensitivitäten im Bereich von 90-100%, Spezifitäten von 93-99%, positiv prädiktive Werte von 80-95% und negativ prädiktive Werte deutlich über 95%.^{19,20}

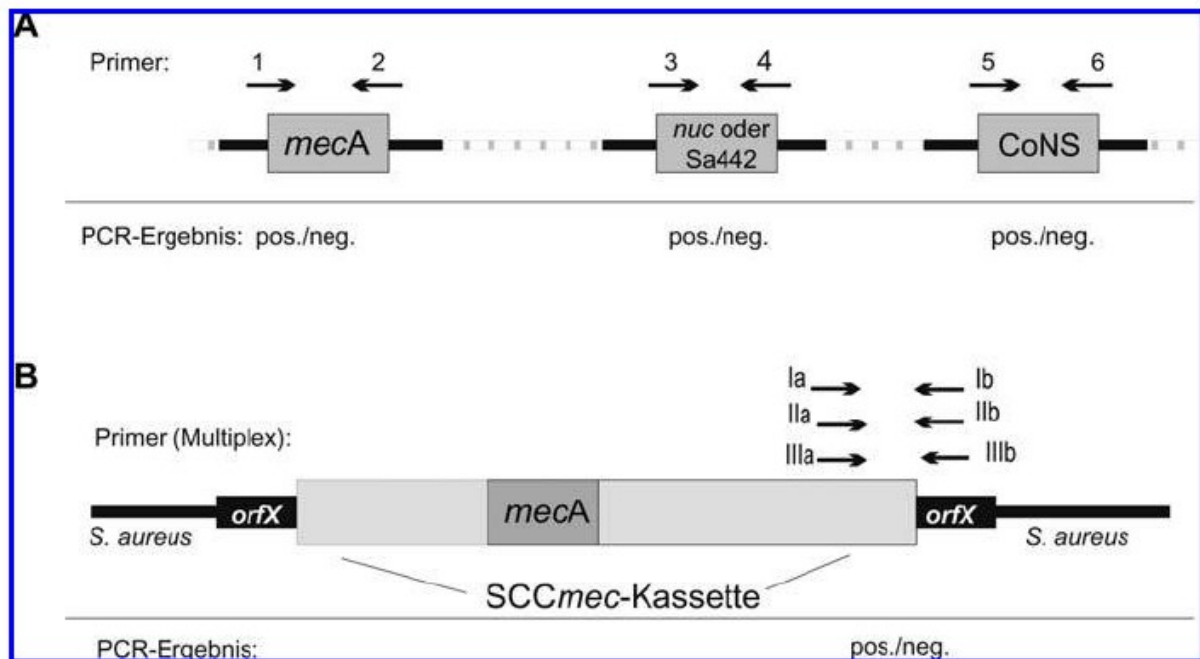


Abbildung 8: Vergleich von getrenntem Nachweis von *mecA*, *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken (*CoNS*) und *SCCmec* basierten Testkonzepten. Die Primerkonstellationen sollen lediglich einen schematischen Vergleich der Testkonzepte ermöglichen.

3.6.2.2 MRSA-Screening mit Hilfe des GeneXperts

3.6.2.2.1 Material

Handschuhe

Reagenzgefäße

Übertragungspipetten

GeneXpert-MRSA-Kartuschen

GeneXpert® Dx-Instrument

3.6.2.2.2 Ablauf

Bei dem GeneXpert-Test handelt es sich um eine REAL-Time-PCR-Methode, die im Jahre 2007 auf den Markt kam. In diesem Protokoll wird die *orfX*-*SCCmec*-Sequenz detektiert und nachgewiesen. Noch am selben Tag wurden die Proben minimal bearbeitet und innerhalb von etwa einer Stunde waren die Ergebnisse ersichtlich. Für dieses Screening war das GeneXpert® Dx-Instrument in Zusammenhang mit einem bestimmten Kartuschensystem, welches die für die PCR notwendigen trocken gefrorenen Bestandteile enthielt, notwendig.²¹ Um Verunreinigungen zu vermeiden, mussten für die nächsten Schritte Handschuhe getragen werden. Der Abstrichtupfer wurde aus dem Transportgefäß entnommen und von der Kappe gelöst. Anschließend wurde er in ein Röhrchen mit Elutionsreagenz überführt und an der Trennstelle des Stiels gekürzt, um das Gefäß verschließen zu können. Die Reagenzien wurden nun 10 Sekunden lang gevortext. Nun konnte mit einer sterilen Übertragungspipette das gesamte Volumen aus dem schwarzen Röhrchen in die Kammer S der GeneXpert-MRSA-Kartusche aliquotiert werden. Die Reagenz 1 wurde in die Kammer 1 überführt, indem man das Dispenser-Ende der Ampulle in die Kammer stellte, und mit vorsichtigem Druck auf die Ampulle deren Inhalt vollständig in die Kartusche füllte. Ebenso ging man mit Reagenz 2 vor, wobei jene in die Kammer 2 gehörte. Anschließend konnte die Kartusche verschlossen werden und in die Tür des Instrumentenmoduls geladen werden. Innerhalb von 15 Minuten nach Hinzufügen der Reagenzien sollte mit dem Test begonnen werden um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Dazu wird die Tür verschlossen und das Gerät per Knopfdruck gestartet. Nach ungefähr 75 Minuten war der Lauf abgeschlossen und die Kartusche konnte nach Entriegelung der Tür entnommen und verwertet werden.

3.6.2.3 MRSA-Detektion mittels BD GeneOhm™MRSA Test

3.6.2.3.1 Materialien

<u>Reagenzien:</u>	<u>Proben-Puffer:</u>	Tris-EDTA-Puffer
	<u>Lysenröhrchen:</u>	Glasperlen
	<u>Master mix:</u>	0,0005% DNA-Polymerase-Komplex
		0,001% Interne Kontrolle–nicht infektiöse DNA
		0,002% Primer
		0,002% Molekular-Proben
		0,05% dAPT, dCTP, dGTP, dTTP
		Rinderserum-Albumin

	Kohlenhydrat
	MgCl ₂
<u>Kontroll-DNA:</u>	Tris-EDTA-Puffer
	Kohlenhydrat
<u>Verdünnungsmittel (Diluent):</u>	Tris-HCl-Puffer MgCl ₂
	(NH ₄) ₂ SO ₄
	KCl
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Pipetten
<u>Geräte:</u>	Vortexer, IKA®Vortex Genius 3
	Zentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5417 R
	Heizblock, Eppendorf Thermomixer comfort
	SmartCycler-Kühlblock
	SmartCycler Mini-Zentrifuge

3.6.2.3.2 Vorgehen

Beim BD GeneOhm™ MRSA Test wurde einer der Tupfer in ein Puffer-Röhrchen überführt, an der Sollbruchstelle abgetrennt und anschließend für 60 Sekunden gevortext. Die überschüssige Flüssigkeit, in der sich nun auch die Bakterien, die im Tupfer adheriert waren, befanden, wurde in ein Lyse-Röhrchen anhand von einer Pipette überführt. Jenes wurde einige Minuten zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand verworfen und 50µl des frischen Probenpuffers hinzugefügt. Durch das Verwerfen von Flüssigkeit wurde die Probe zudem aufkonzentriert. Anschließend wurden die Röhrchen gevortext und kurz anzentrifugiert bevor sie für 5 min auf 98°C erhitzt wurden, um vorhandene Inhibitoren zu eliminieren. Das Bakterienlysat konnte dann auf Eis oder in einem Kühlblock gelagert werden, bis der MasterMix angesetzt wurde. Alternativ konnte es auch eingefroren werden, um zu einem anderen Zeitpunkt fortzufahren.

Der MasterMix wurde in einem speziell gekennzeichneten, separaten Raum angesetzt, um Verunreinigungen zu vermeiden. Dazu wurde die Hauptmischung mit den Primern und der DNA-Polymerase mit einem Tris-HCl-Puffer verdünnt, kurz gevortext und anzentrifugiert. Anschließend wurde der Mix auf die benötigten SmartCycler-Gefäße im Kühlblock aliquotiert. Dieser Schritt war sehr schnell und leicht durchzuführen, weil die Reagenzien nicht im Gefrierfach aufbewahrt, und daher nicht vor dem Pipettieren aufgetaut werden mussten. Die Zugabe der Lysate fand wieder in einem anderen Raum statt, ebenso wie die Zugabe der

Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde Probenpuffer prozessiert. Bevor die Gefäße in den SmartCycler-Block entsprechend den Programmvorgaben positioniert werden konnten, mussten sie in der SmartCycler Mini-Zentrifuge zentrifugiert werden. Dieser Vorgang war etwas umständlich, da man sehr vorsichtig sein muss, um nicht die Stelle zu berühren, an der die Messung durchgeführt wurde. Die Gefäße waren zudem sehr klein und unhandlich.



Abbildung 9: SmartCycler Mini-Zentrifuge

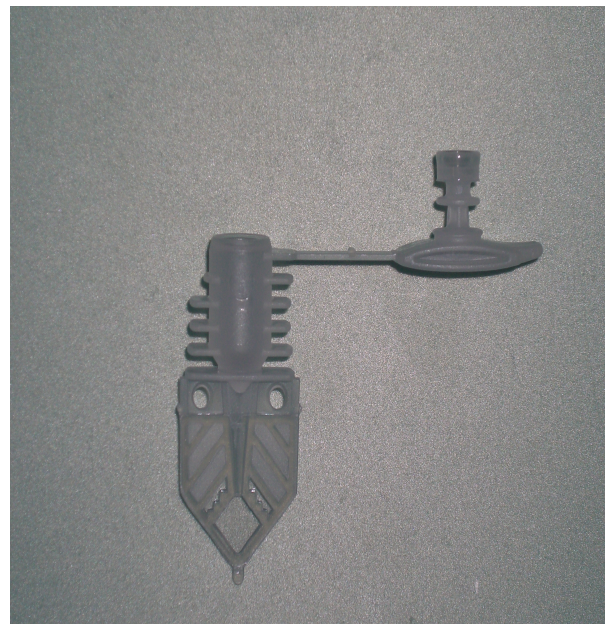


Abbildung 10: SmartCycler Reaktionsgefäß

Das Programm konnte sofort gestartet werden und war sehr anwenderfreundlich. Der Lauf wurde im aufgerufenen Programm benannt und konnte nach Eingabe der Anzahl der Proben, der Chargennummer und des Verfallsdatums gestartet werden:

Als erstes wurden die Proben lysiert. Anschließend fand die Amplifikation der Zielsequenz, einem DNA-Abschnitt nahe der Insertionsstelle der Staphylokokkus-Kassette *mec* (*SCCmec*), statt. Die amplifizierten Zielsequenzen wurden am Molekular-Beacon detektiert. Das ist ein haarnadelförmiges, einzelsträngiges Oligonukleotid, welches an einem Ende mit einem Emissionsunterdrücker (dem sog. „Quencher“) und am anderen Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (dem sog. „Fluorophor“) markiert war. Wenn

Zielsequenzen anwesend waren, öffnete sich die Haarnadelstruktur nach der Beacon-Hybridisierung, woraufhin Fluoreszenz emittiert wurde. Zur Feststellung von MRSA-Amplikons enthielt der Molekular-Beacon das Fluorophor FAM am 5'-Ende. Jedes Beacon-Hybrid fluoreszierte bei einer Wellenlänge, welche für den Fluorophor charakteristisch war. Die Menge der Fluoreszenz in jedem gegebenen Zyklus hing von der Menge der spezifischen Amplikons ab, die zu diesem Zeitpunkt gebildet wurden. Der Smart-Cycler® überwachte gleichzeitig die Fluoreszenz, welche von jedem Beacon ausgesandt wurde und interpretierte alle Daten. Am Ende des Zyklus, der etwa eine Stunde dauerte, wurden die farblich untermalten Endergebnisse von der Cepheid Smart Cycler®-Software geliefert und konnten direkt abgelesen werden.

Allerdings konnte man in dem Assay, in dem die Läufe durchgeführt wurden, keine Kurven und somit auch keine Crossing Points (CP) bestimmt werden. In die Blocks passten nur 14 Proben, plus die Positiv-, und Negativkontrolle. Wenn man einen größeren Umfang an Proben hatte, dann war es ein zeitaufwendiges Verfahren. Sollten während des Laufs noch Positionen unbesetzt bleiben, konnte jederzeit ein neuer Lauf auf den leeren Positionen gestartet werden, ohne den vorherigen unterbrechen zu müssen.

Der Zeitgewinn, der durch die kurze PCR-Laufzeit gewonnen wurde, ging bei der Probenaufbereitung verloren.

3.6.2.4 LightCycler®MRSA Advance Test

3.6.2.4.1 Material

Advanced Lysis Kit (P/N 05205751 190): LYS(LysisReagenz)

LightCycler® MRSA Advanced Test (P/N 05205735 190):

-MRSA RXNMX

-MRSA DETMX

-MRSA (+)C

3.6.2.4.2 Instrumente und Software

LightCycler® 2.0. Instrument

LightCycler® Software 4.1.

MagnaLyser Instrument

LC Carousel Centrifuge

3.6.2.4.3 Andere Geräte und Verbrauchsmaterialien

Handschuhe, Gaze, Schere, 70% Ethanol, justierbare Pipetten in den Größen 10, 100 und 1000µl, trockener Heizblock auf 95,0°C±2,0°C, Vortexer, Mikrozentrifuge für 2,0ml Tubes mit 8.000-20.000xg, sterile Microcentrifugal-Tubes (1,5ml), LightCycler®Kapillaren 20µl

3.6.2.4.4 Vorgehensweise

Bei diesem Verfahren wurden die Tupfer in ein eindeutig nummeriertes Lysat-Tube positioniert und die Tupferspitze mit einem Glühdraht-Akkulötkolben vom Rest des Tupfers kontaminationssicher abgetrennt. Als Negativkontrolle wurde ein einzelner steriler Tupfer verwendet, der für eine Minute im Aufbewahrungsgefäß bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde. Die Tubes wurden fest verschlossen und bei 95°C für 2 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden sie für 70 Sekunden im MagNALyser bei 5000 rpm lysiert und dann 1 Minute zentrifugiert. Schon innerhalb kürzester Zeit hatte man die entsprechende DNA-Präparation vorliegen. An diesem Punkt konnte man die Lysate bis zu einem Monat einfrieren, für 6 Tage im Kühlschrank aufbewahren oder sofort mit dem Testprocedere fortsetzen. Im Rahmen der hier dargestellten Studie wurden unsere Proben alle am gleichen Tag weiterprozessiert.

Im Master Mix-Raum wurden die Reagenzien schon im Voraus aufgetaut, um längere Wartezeiten zu vermeiden. Vor der Verwendung wurden sie kurz anzentrifugiert und gevortext. Die benötigte Menge wurde einer Tabelle entnommen und die RXNMX mit der DETMX gemischt. Anschließend wurde der Working Master Mix auf die einzelnen Kapillaren verteilt. Die Reaktionsgemische wurden dann mit den Lysaten in einem anderen Raum komplettiert, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Positivkontrolle kam dann noch im anderen Raum dazu. Die geschlossenen Kapillargefäßen wurden in eine LC Carousel Centrifuge gesetzt und die kompletten Reaktionsgemische kurz abzentrifugiert. Dieses Carousel konnte nun in den LightCycler eingesetzt werden oder bei besetztem Gerät für bis zu drei Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die LightCycler 2.0 Software wurde geladen und das Macro gestartet.

Der Run Name und die Anzahl der Proben musste ausgewählt werden, dann konnte der Run gestartet werden und lief etwa 75 Minuten.

3.6.2.5 PCR mit dem LightCycler 480

3.6.2.5.1 Material

- S.E.T.S. (Swab Extraction Tube System) Cat.No.:3 315568, Roche Diagnostics, Mannheim - Lysostaphin 5mg/ml zur
- Proteinase K, recombinant, PCR Grade, Cat.No. 03 115 836 001
- MagNA Pure LC Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Cat. No. 03 730 964 001, Roche Diagnostics GmbH Mannheim
- LightCycler® DNA Master HybProbe
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96
- Pipetten

3.6.2.5.2 Geräte

- Engel-Löter B 50 A
- Vortex-Genie2®, Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
- Thermomixer comfort, 5437, Eppendorf-Netheier-Hinz GmbH, No. 535002156
- Centrifuge 5417R , Eppendorf, No. 5000046788
- Centrifuge 5804, Eppendorf, No. 580400352
- LightCycler®480

3.6.2.5.3 PCR-Protokoll

Die BD-Lysate wurden nach Abschluss der eigentlichen Evaluierungsstudie wieder aufgetaut, gevortext und kurz an zentrifugiert und für eine Testung mit dem laborinternen in-house Protokoll zum PCR-gestützten MRSA Direktnachweis verwendet. Das Lysat wurde in die entsprechenden Reaktionsgemische aliquotiert und der Master Mix nach Vorschrift im Master Mix Raum hergestellt. Dieser Schritt war bei dieser PCR im Vergleich zu den beiden anderen besonders aufwendig, weil die einzelnen Reaktionskomponenten separat pipettiert werden mussten und nicht bereits in einer gebrauchsfertigen Form vorlagen. Dazu wurden für je eine Probe 6,8 µl H₂O, 3,2µl MgCl₂, 0,1µl Primer orf-x1, 0,1µl Primer orf-x3, 0,1µl Primer orf-x6a, 0,1µl Primer mec-AMS, 1,33 µl HybProbe mec-Am-HP3, 1,33 µl HybProbe mec-AM-HP4 und 2µl LC Fast Start in ein Reagenzgefäß pipettiert und kurz gevortext.

Zusätzlich fand bei jeder Probe ein β -Globin-Nachweis statt. β -Globin ist Teil des menschlichen Hämoglobins und somit in jeder menschlichen Zell-DNA verschlüsselt. Der Nachweis dient zum einen als Inhibitionskontrolle d.h. ob etwa Nasensalbe oder ähnliches eine Inhibition der Reaktion herbeiführte. Dafür wird später der Amplifizierungskurve entnommen, ob die quantitativen Werte in dem für β -Globin charakteristischen Bereich liegen.

Zum anderen dient er zur Kontrolle des Abstrichs. Denn unabhängig von welcher Körperregion die Probe entnommen wurde, werden auch menschliche Zellen dabei abgestrichen, die nachweisbar sein müssen.

Dafür wird ein zweiter Master Mix (MIX2) hergestellt. Pipettiert wurden 7,2 μ l H₂O, MgCl 2,4 μ l, 0,25 μ l Beta-LCF, 0,5 μ l Beta-Globin 339r, 1,33 μ l Beta-HP3, 1,33 μ l Beta-HP4 und 2 μ l LC Fast Start. Die Proben wurden für jeden Master-Mix einmal angesetzt. Dafür pipettierte man 15 μ l der jeweiligen Master Mix-Lösung in die Vertiefungen der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96. Dazu kamen jeweils 5 μ l des DNA- Isolats. Für die Positiv-Kontrolle wurden 5 μ l verdünnter MRSA-DNA hinzugefügt. In der Negativ-Kontrolle fehlte DNA-Eluat. Die befüllte Platte wurde mit einer speziellen Folie verschlossen und danach für 2 Minuten bei 1500xg zentrifugiert. Die Proben waren nun soweit, dass sie in den LightCycler 480 eingelegt werden konnten, wo die PCR stattfand.

Entsprechend dem allgemeinem PCR-Ablauf, werden die Proben 10 Minuten lang auf 95°C erhitzt. In dieser Denaturierungsphase werden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge geteilt. Dann beginnt die "Cycling"-Phase, wobei die 95°C 10 Sekunden lang gehalten, anschließend auf 55°C herabgekühlt und dann wieder 10 Sekunden lang gehalten werden. Hier findet auch die Fluoreszenz-Messung bzw. Detektion statt. Im Master Mix1 sind HybProbes enthalten, die als fluoreszierende Sonden fungieren. Die einen Sonden tragen am 5'-Ende ein Fluorescein Farbstoff, die anderen einen Farbstoff genannt RedX. Während des Abkühlvorgangs auf 55°C sind Sonden sowie Primer in der Lage an ihre komplementären Sequenzen in der DNA zu binden. Eine Lichtquelle regt die Fluoresceinmarkierungen der Sonde 1 mit Licht der Wellenlänge von 530 nm an. Sobald die beiden Sonden nebeneinander an der Zielsequenz binden können und die beiden Farbstoffmoleküle sich annähern, kommt es über das angeregte Fluorescein-Molekül zu einer Resonanz-übermittelten Anregung des Farbstoffmoleküls RedX auf der benachbarten Sonde. Dabei wird Licht mit einer definierten Wellenlänge von 640 nm emittiert, das im LightCycler Gerät quantitativ und für jede Reaktionskapillare getrennt gemessen wird.

Nach dem Cycling-Modul folgt ein Temperaturanstieg auf 72°C, der für 12 Sekunden gehalten wird, bevor erneut auf 95°C erhitzt wird. Dieser Zyklus wird im gesamten Lauf 50 Mal wiederholt.

Im Anschluss findet zur Schmelzpunktanalyse ein weiteres Intervall statt, das mit einem Temperaturabfall erst auf 62°C für 10 Sekunden und dann kurz auf 40°C beginnt. Von 40°C wird kontinuierlich die Temperatur auf 95°C erhöht, wo die Abkühlphase beginnt.

Anschließend kann graphisch die Amplifizierungsanalyse sowie die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Begriffsbestimmung

- Die **Sensitivität** eines diagnostischen Testverfahrens gibt an, bei welchem Prozentsatz erkrankter Patienten die jeweilige Krankheit bzw. eine Infektion durch die Anwendung des Tests tatsächlich erkannt wird, d.h. ein positives Testresultat auftritt. Sie wird definiert als der Quotient aus richtig positiven Testergebnissen und der Summe aus richtig positiven und falsch negativen Testergebnissen.

$$\text{Sensitivität} = 100 \times a/(a+c)$$

- Die **Spezifität** eines diagnostischen Testverfahrens gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der nicht infizierte Patienten im entsprechenden Testsystems auch als (richtig) negativ erkannt werden. Sie wird definiert als der Quotient aus richtig negativen Testergebnissen und der Summe aus falsch positiven und richtig negativen Testergebnissen – also allen Testergebnissen, denen tatsächlich keine Infektion zugrunde lag.

$$\text{Spezifität} = 100 \times d/(d+b)$$

4.2 Auswertung der kulturellen Ergebnisse

In toto wurden 50 Proben untersucht, die nach 24h Aufbewahrung im Brutschrank zum ersten Mal betrachtet wurden. Beobachtet man dabei bereits ein *S. aureus*-Wachstum, wurden die weiteren nötigen Tests durchgeführt, und die Platte erneut nach 24h ausgewertet. Beim

Ausbleiben eines Wachstums von Bakterienkolonien, erfolgte eine weitere Bebrütung und am folgenden Tag die Ablesung. Für die Studie war alleinig die Information, ob MRSA-Wachstum vorhanden oder nicht vorhanden war, ausschlaggebend. Somit ergab sich folgende Auswertung: Auf 10 der Blutagar-Platten wurde MRSA-Wachstum abgelesen, die restlichen 40 waren auch nach 48h noch negativ.

	Kein MRSA-Wachstum	MRSA-Wachstum
50 Proben insgesamt (Regensburg)	40	10
ID	Alle anderen	REG_01,REG_06, REG_12,REG_16,REG_18, REG_19,REG_20, REG_21,REG_36,REG_44
Prozentuale Angabe	80%	20%

Die kulturellen Ergebnisse der Universitätsklinik Stuttgart wurden ebenfalls nach den gleichen Kriterien bewertet. Hier ergaben die Plattenablesung, dass auf 8 Platten MRSA nachgewiesen werden konnte, und die anderen 42 negativ waren.

	Kein MRSA-Wachstum	MRSA-Wachstum
50 Proben insgesamt (Stuttgart)	42	8
ID	Alle anderen	STU_1, STU_2, STU_3, STU_5, STU_6, STU_9, STU_10, STU_31
Prozentuale Angabe	84%	16%

Von den zeitgleich gesammelten und ausgewerteten 100 Abstrichen führten 18% zu einem positiven kulturellen Ergebnis:

	Kein MRSA-Wachstum	MRSA-Wachstum
100 Proben insgesamt (Regensburg+Stuttgart)	82	18
Prozentuale Angabe	82%	18%

Die Bouillon-Bebrütung wurde als home-brew Rezept zwar neben der Studie mit den 50 Probeabstrichen aus Regensburger durchgeführt, wurde aber nicht in die Studien-Bewertung mit einbezogen und auch nicht in Stuttgart durchgeführt.

Bei der Auswertung der Bouillon konnte lediglich von *S. aureus* (STAU)-Wachstum ausgegangen werden, wenn sie trüb verfärbt war. Anschließend musste aber noch eine extra Methicillin-Resistenztestung erfolgen.

	Kein STAU-Wachstum	STAU-Wachstum
50 Proben insgesamt (Regensburg)	40	10
ID	Alle anderen	REG_01,REG_06, REG_12,REG_16,REG_18, REG_19,REG_20, REG_21,REG_36,REG_44
Prozentuale Angabe	80%	20%

4.3 Auswertung der PCR-Ergebnisse

4.3.1 GeneXpert-Ergebnisse

Die Proben-Testung mit dem GeneXpert fand ebenfalls nur in Regensburg statt, da die Stuttgarter Universitätsklinik nicht über dieses Testsystem verfügt. Von den 50 Probetupfern waren 9 positiv getestet worden und die restlichen 41 als negative Ergebnisse beurteilt worden.

Im Vergleich zur positiven Kultur fiel das PCR Ergebnis für MRSA bei der Probe REG_19 aber negativ aus.

	Kein MRSA-Nachweis	MRSA-Nachweis
50 Proben insgesamt (nur Regensburg)	41	9
ID	Alle anderen + REG_19	REG_01,REG_06, REG_12,REG_16, REG_18,REG_20, REG_21,REG_36, REG_44
Prozentuale Angabe	82%	18%

Die Ergebnisse werden beim GeneXpert in Form von Tabellen und Diagrammen angegeben. Die Auswertung findet anhand von dem Wert des CP (crossing point) statt, der systemeigen festgelegt wird, und auch bei schwach positivem Wert angezeigt wird. So kann es eventuell bei einem sehr schwach positiven Abstrich zu einem negativen Ergebnis kommen. Durch Vergleiche solcher diskrepanten Ergebnisse und des dazugehörigen CP, kann das Ergebnis noch modifiziert werden.

4.3.1.1 BD GeneOhm™MRSA Test-Ergebnisse

Dieses Verfahren wurde sowohl mit den Proben aus Regensburg als auch mit denen aus Stuttgart getestet, wobei die Stuttgarter ihre PCR-fertigen Lysate im gefrorenem Zustand nach Regensburg schickten, um sie von uns testen zu lassen, da sie nicht über den SmartCycler verfügten.

	Kein MRSA-Nachweis	MRSA-Nachweis
50 Proben insgesamt (Regensburg)	40	10
ID	Alle anderen	REG_01,REG_06, REG_12,REG_16, REG_18, REG_19,REG_20, REG_21,REG_36, REG_44
Prozentuale Angabe	80%	20%

Ergebnisse der Stuttgarter Tupfer:

	Kein MRSA-Nachweis	MRSA-Nachweis
50 Proben insgesamt (Stuttgart)	43	7
ID	Alle anderen + STU_10	STU_1, STU_2, STU_3, STU_5, STU_6, STU_9, STU_31
Prozentuale Angabe	86%	14%

Gesamtergebnisse:

	Kein MRSA-Nachweis	MRSA-Nachweis
100 Proben insgesamt (Regensburg+Stuttgart)	83	17
Prozentuale Angabe	83%	17%

4.3.2 LightCycler®MRSA Advance Test-Ergebnisse

Die LightCycler-Tests wurde an beiden Studienorten voneinander unabhängig durchgeführt. Dabei kam es zu folgenden Ergebnissen:

	Kein MRSA-Nachweis	MRSA-Nachweis
50 Proben insgesamt (Regensburg)	39	11
ID	Alle anderen	REG_01,REG_06, REG_12,REG_16, REG_18, REG_19,REG_20, REG_21, REG_22, REG_36, REG_44
Prozentuale Angabe	78%	22%

Bei den Proben aus Stuttgart:

	Kein MRSA-Nachweis	MRSA-Nachweis
50 Proben insgesamt	42	8
ID	Alle anderen	STU_1, STU_2, STU_3, STU_5, STU_6, STU_9, STU_10, STU_31
Prozentuale Angabe	84%	16%

Gesamtergebnisse:

	Kein MRSA-Nachweis	MRSA-Nachweis
100 Proben insgesamt (Regensburg+Stuttgart)	81	19
Prozentuale Angabe	81%	19%

4.3.3 PCR-Ergebnisse aus dem in-house MRSA Protokoll mit dem LC480

Dieses Verfahren wurde auch nur zusätzlich an der Universitätsklinik Regensburg durchgeführt. Dabei kam es zur folgenden Zusammenstellung:

	Kein MRSA-Nachweis	MRSA-Nachweis
50 Proben insgesamt	40	10
ID	Alle anderen	REG_01,REG_06, REG_12,REG_16, REG_18, REG_19,REG_20, REG_21,REG_36, REG_44
Prozentuale Angabe	80%	20%

5 Diskussion

5.1 Ergebnisvergleich

	Kein MRSA-Nachweis	MRSA-Nachweis
Kulturelle Ergebnisse (100/REG/STU)	82/40/42	18/10/8
Prozentuale Angabe (Insg/REG/STU)	82/80/84%	18/20/16%
GeneXpert (50 REG)	41	9
Prozentuale Angabe (REG)	82%	18%
BD GeneOhm™MRSA Test (100/REG/STU)	83/40/43	17/10/7
Prozentuale Angabe (Insg/REG/STUT)	83/80/86%	17/20/14%
LightCycler®MRSA Advance Test (100/REG/STU)	81/39/42	19/11/8
Prozentuale Angabe	81/78/84%	19/22/16%
LightCycler 480 (50 Proben)	40	10
Prozentuale Angabe	80%	20%

5.1.1 Kulturnachweis

Auch heutzutage gilt der kulturelle Nachweis immer noch als eine Art von „Goldstandard“, und hat in diesem Zusammenhang eine hohe diagnostische Wertigkeit. Leider liegen bei diesem diagnostischen Verfahren im Vergleich zur PCR die Ergebnisse erst nach frühestens 24 bzw. 72

Stunden vor, so dass bei vorsorglichen Isolierungen mindestens zwei bis drei Tage bis zur MRSA-Befundübermittlung eingeplant werden müssen. Durch die Entwicklung neuerer Verfahren, die sich chromogener Medien bedienen, können die Ergebnisse schon nach 24 Stunden abgelesen werden. Es gibt auch weitere experimentelle Ansätze, mit denen versucht wird, die Zeit des Kultivierens zu verkürzen. Letztendlich aber wird die Wachstumsgeschwindigkeit der Staphylokokken ein limitierendes Problem darstellen, so dass man in allen Fällen mindestens zwölf Stunden auf das kulturelle Ergebnis warten werden muss. Bei den Selektivmedien lassen sich Sensitivitäten zwischen 60 und 95% und Spezifitäten von bis zu 99% erreichen.²² Auch der kulturelle Nachweis kann durch zahlreiche Faktoren negativ beeinträchtigt werden: wurde vor dem Abstreichen eine Nasensalbe oder Vaseline benutzt, können die Ergebnisse falsch-negativ ausfallen. Sind am Abstrichsort die Erreger in nur geringen Mengen vorhanden, oder werden sie unregelmäßig auf den Tupfern verteilt, kann das auch zu einem negativen Resultat führen. Gegenüber den PCR-Verfahren werden für den Kulturnachweis immer vermehrungsfähige Keime gebraucht, um einen erfolgreichen Nachweis führen zu können.

Deren hohe diagnostische Wertigkeit zeigt sich auch in dieser Studie: hier wurden eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 100% bei der Auswertung der kulturellen Nachweisverfahren ermittelt. Von den 100 Proben wurden 18 auf MRSA positiv getestet.

5.1.2 GeneXpert MRSA Test

Der gleichzeitig durchgeführte GeneXpert MRSA Test kam dagegen nur auf 9 positive Ergebnisse. Im direktem Vergleich mit dem Roche LightCycler® MRSA Advanced Test erkannte der GeneXpert MRSA zwei Proben weniger als MRSA-positiv. Die Positiv/Negativ-Schwelle ist hier offensichtlich so eingestellt, dass einige schwach-positive Proben schlussendlich als negativ bewertet werden.

Bei Kenntnis der CP-Werte von normalen positiven Proben und genauem Vergleich der CPs dieser zwei Proben (REG_19 und REG_22) war eine Tendenz der CP-Werte zum eingestellten Schwellenwert erkennbar (REG_19 mit CP-Wert von 38,7 und REG_22 mit 37).

In der folgenden Graphik des Auswertungsprogramms ist die Probe REG_19 dargestellt. Man sieht den grünen Graphen, der die Positivkontrolle darstellt und einen weitaus höheren Peak erzeugt als die Probe selbst. Dennoch ist nicht zu übersehen, dass auch das Sample einen leichten Anstieg (Amplifikation von MRSA DNA) aufweist. Die Analyse ergab einen CP von 38,7. Die Proben, die laut geräteeigener Software zu einem positiven Ergebnis führen würden, müssten unter „37“ liegen.

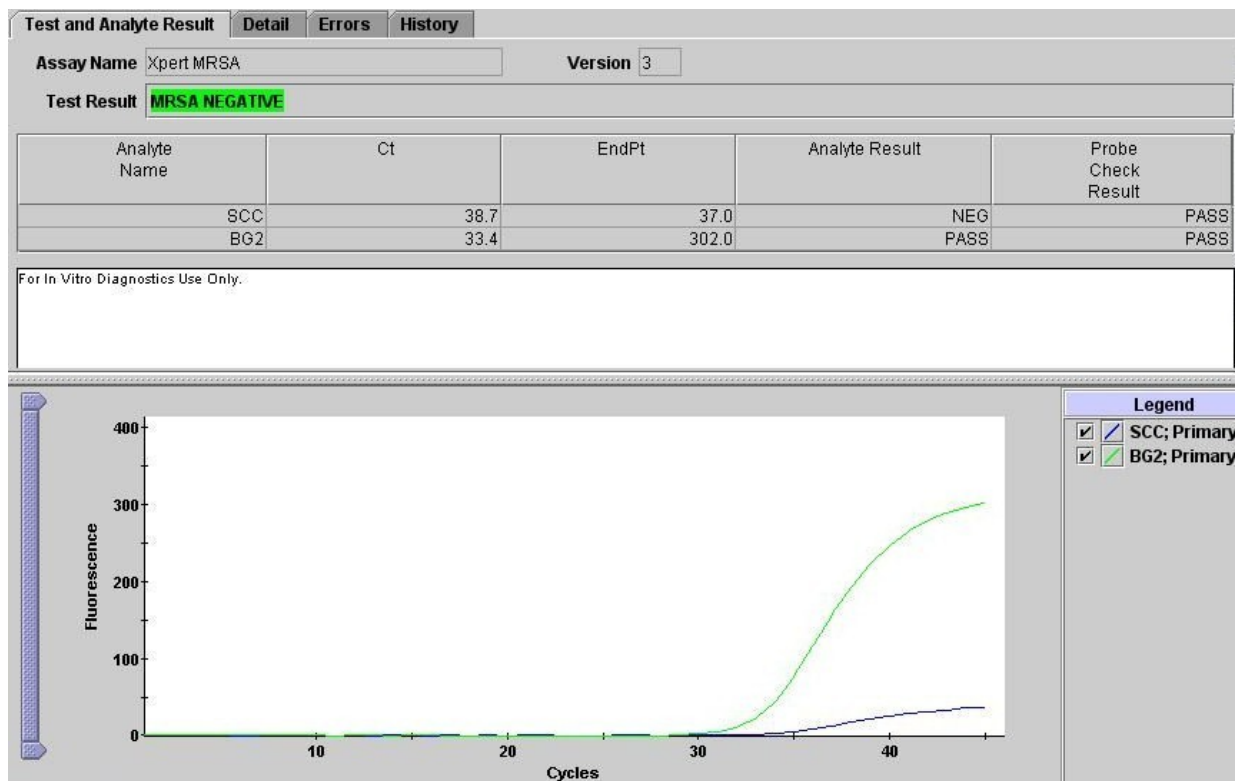


Abbildung 11: Analytische Auswertung der Probe REG_19

Die Probe REG_22 weist bereits einen CP von 37 auf, und wird auch noch nicht als positiv vom System erkannt, auch wenn sich in Abbildung 12 schon ein deutlich steilerer Anstieg zeigt, als bei REG_19 in Abbildung 11.

Dieses Interpretationsproblem bei schwach MRSA-positiven Proben ist für den GeneXpert MRSA Test bekannt und auch publiziert.²¹ Daher müssen bei diskrepanten Ergebniskonstellationen die analytischen Auswertungen kritisch überprüft und die CPs verglichen werden.

Mit dem GeneXpert MRSA Test erreichten wir bei der Sensitivität Werte von 90% und bei der Spezifität 100%. Die Laufzeit eines Runs betrug 75 Minuten.

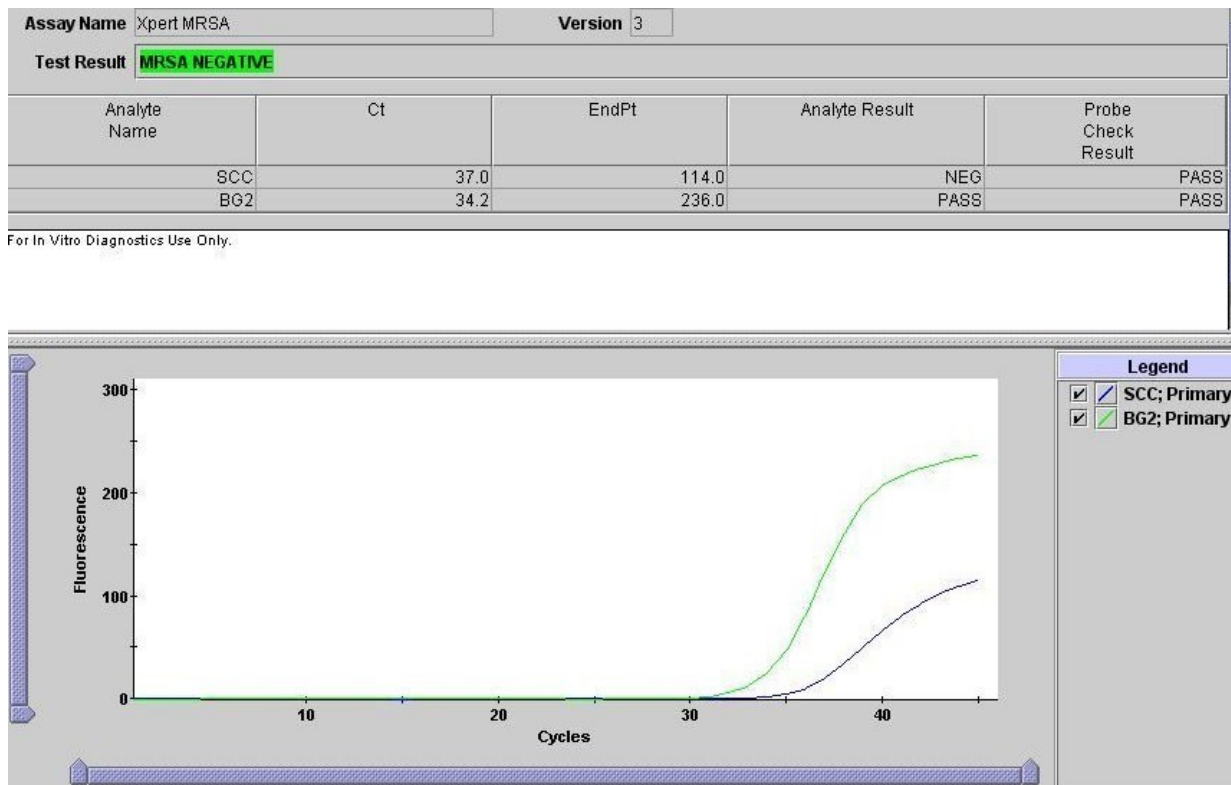


Abbildung 12: Analytische Auswertung der Probe REG_22

5.1.3 BD GeneOhm™MRSA Test

Der BD GeneOhm™MRSA Test lieferte 17 positive Ergebnisse, was zu einer Sensitivität von 94% und einer Spezifität von 100% führt. Bei den Stuttgarter Proben ist die STU_10 nicht detektiert worden, obwohl der Lauf zweimal durchgeführt worden ist und die anderen Verfahren ein positives Ergebnis erwarten ließen. Solche Konstellationen können gegebenenfalls entstehen wenn einer von den zwei Tupfern nicht ausreichend an der Nasenschleimhaut entlang geführt worden ist, und kein DNA-Material aufgenommen worden ist. Studien konnten beweisen, dass die Ergebnisse verbessert werden können, wenn zuvor eine kulturelle Anreicherung der Erreger über mehrere Stunden durchgeführt wird. Dabei reichen schon 10 Erreger pro Abstrich aus, um trotzdem zu einem positiven Ergebnis zu führen. Allerdings verlängert sich damit auch die Ergebnisübermittlung um einen weiteren Tag.²³ Zudem können solche Ergebnisse durch eine nicht erkannte Inhibition der Reaktionen auftreten. Inhibitoren der PCR-Reaktion können z.B. Medikamentenreste (Mupirocin) oder Vaseline am Abstrichsort sein.

5.1.4 LightCycler®MRSA Advance Test

Von den insgesamt 100 untersuchten Proben wurden im LightCycler®MRSA Advance Test (LC) 19 Proben positiv getestet. Interessant ist die Probe REG_22, die zwar nur einen sehr schwachen Peak in der Schmelzkurvenanalyse aufweist, aber als MRSA-positiv bewertet wird. Von den übrigen PCR-gestützten Testverfahren wie auch der Kultur wurde sie nicht als MRSA positiv erfasst.

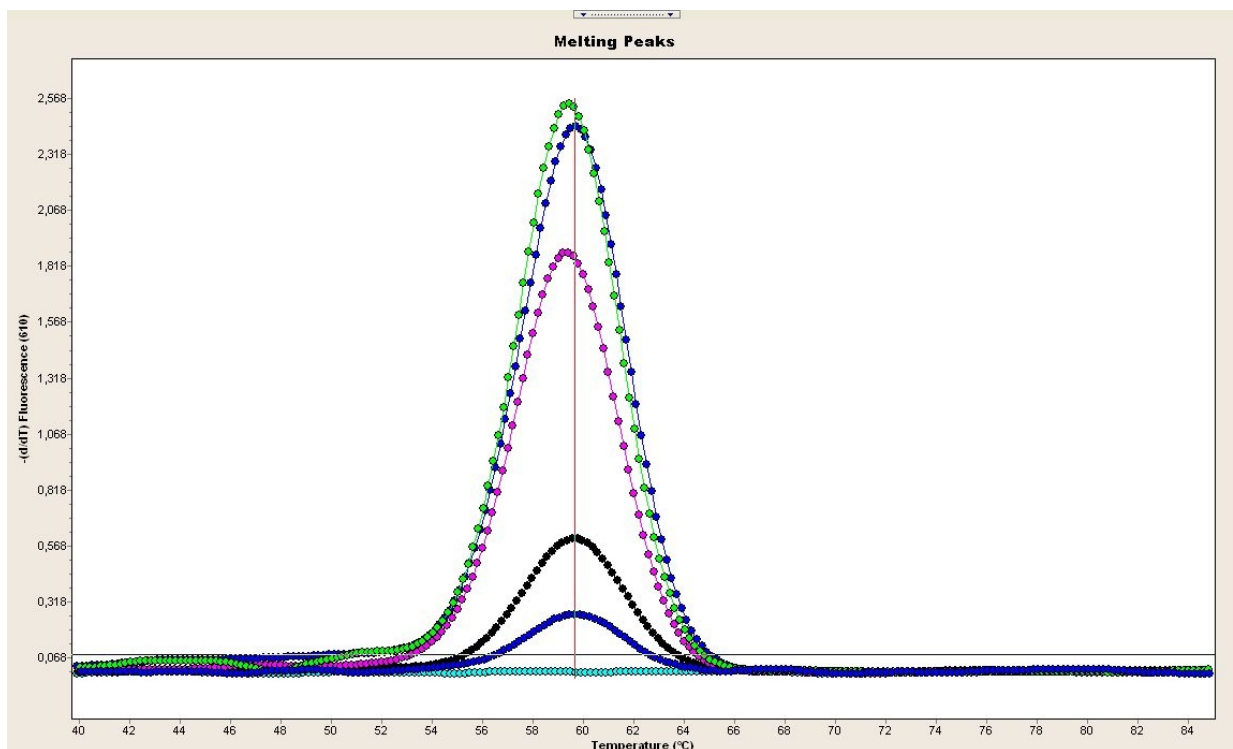


Abbildung 13: Schmelzanalyse des LightCycler®MRSA Advance Tests

Include	Color	Pos	Name	Baseline	Tm1	Height1
<input checked="" type="checkbox"/>	Blue	1	#PC#	0,085	59,65	2,36
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyan	2	#NC#	0,085		
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	3	EPC7	0,085	59,55	1,17
<input checked="" type="checkbox"/>	Black	4	REG19	0,085	59,60	0,51
<input checked="" type="checkbox"/>	Magenta	5	REG20	0,085	59,29	1,79
<input checked="" type="checkbox"/>	Green	6	REG21	0,085	59,39	2,45
<input checked="" type="checkbox"/>	Blue	7	REG22	0,085	59,65	0,18

Offensichtlich ist der Roche MRSA-Test sensitiver, denn bei genauerer Betrachtung wies diese Probe auch im GeneXpert MRSA Test einen deutlich erhöhten CrossingPoint(CP)-Wert (37) auf, der aber in der systemeigenen Software als negativ bewertet wurde. Ebenso ist die Probe REG_19 nicht durch ihn detektiert worden.

Anhand des Abstrichs REG_22 zeigt sich die Diskrepanz zwischen dem PCR-Verfahren und dem Kulturansatz. Das erstere Verfahren bietet den Vorteil, dass bereits geringste Menge an DNA genügen, um noch ein positives Ergebnis zu liefern. Das Bakterium muss nicht zwingend vermehrungsfähig sein, denn auch avitale Keime können zu positiven PCR-Ergebnissen führen, solange DNA-Bestandteile extrahiert werden können.

Andererseits können dadurch PCR-gestützte Verfahren aber auch zu falsch positiven Ergebniskonstellationen führen: Sobald ein Patient zuvor unter MRSA-wirksamer Antibiotika-Therapie stand, gilt er vielleicht kulturell als negativ, kann aber durch noch vorhandene DNA-Bestandteile bei der PCR falsch positiv ausfallen.

Dieser Patient war in seiner Krankenakte schon mehrfach kulturell positiv auf MRSA getestet worden und eine DNA-ämie ist sehr wahrscheinlich.

Im Gegensatz zum Kulturnachweis sind beim PCR-gestützten Verfahren noch keine verlässlichen Daten bekannt, inwieweit nach Beginn einer MRSA-wirksamen Medikation ein positiver oder negativer MRSA DNA-Nachweis mit einer erfolgreichen Eradikation des Keimes korreliert. Es ist anzunehmen, dass das Genom von nicht mehr vermehrungsfähigen Bakterien noch Tage bis Wochen am Infektionsort vorliegt und somit bei den hochsensitiven PCR-Diagnostikverfahren zu falsch positiven Ergebnissen führen kann.

Beim LightCycler®MRSA Advance Test ergab sich eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 98,7%.

5.1.5 In-House PCR mit dem LightCycler 480

Bei den nur in Regensburg durchgeführten Verfahren lieferte die Regensburger in-house MRSA PCR 10 übereinstimmend positive Ergebnisse mit der Kultur (Sensitivität=100%, Spezifität=100%).

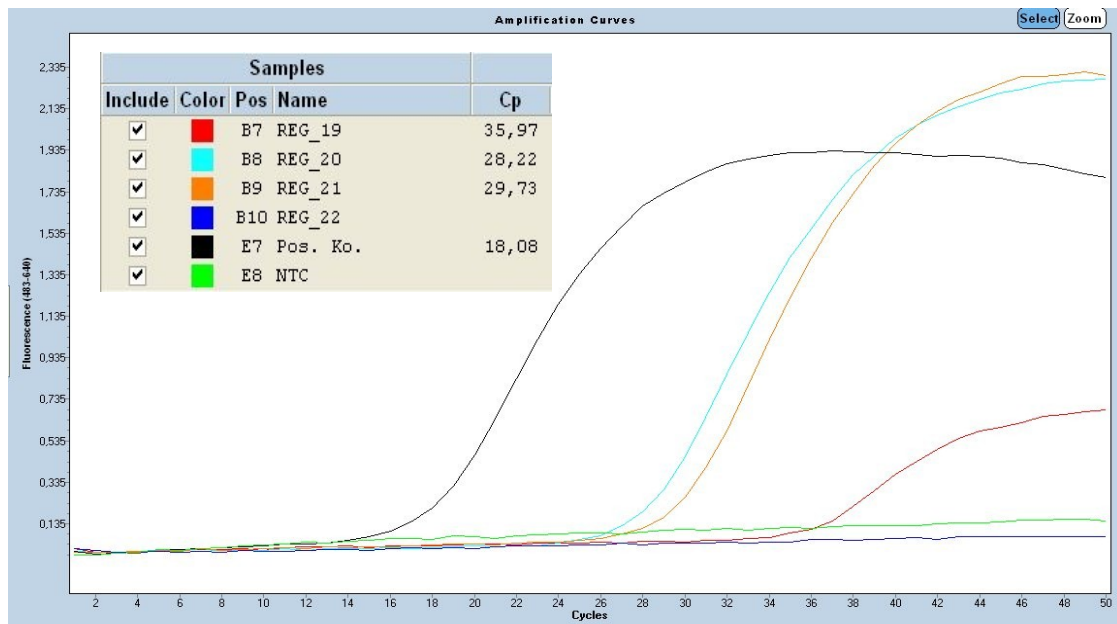


Abbildung 14: Schmelzkurve des LightCyclers 480

Interessanterweise erkennt man bei diesem Verfahren bei der kulturell negativen Probe, aber im LightCycler®MRSA Advance Test positiven REG_22 nicht einmal einen leichten Anstieg in der Schmelzkurve.

5.2 Anwenderfreundlichkeit

5.2.1 Kultureller Nachweis

Der kulturelle Nachweis ist eine der ersten und immer noch sichersten Methoden MRSA nachzuweisen. Durch das Zellwachstum während der Anzucht ist die Zeit bis zur Ergebnisübermittlung auf mindestens 24 Stunden festgelegt. Neuere Verfahren, die chromogene Medien nutzen, ermöglichen in diesem Fall eine schnellere Ergebnisübermittlung. Mit dem von uns gewählten Verfahren waren zum endgültigen Nachweis von MRSA 48 bis 72 Stunden nötig. Das Ausstreichen der Tupfer nach dem 3-Ösen-Schema ist ein ziemlich sicheres und einfaches Vorgehen. Viel mehr Erfahrung und ein geschultes Auge erfordert das Ablesen der Platten. Hierbei ist es unerlässlich, die Proben alle 24h zu betrachten, um verdächtige Kolonien zu isolieren und damit weitere Untersuchungen durchzuführen. Außerdem bietet dieser Nachweis einen weiteren Vorteil. Die entstehenden Materialkosten sind 10fach geringer als die durchschnittlicher PCR-Verfahren. Zudem entfallen hier auch die Anschaffungskosten für teure Geräte.

5.2.2 GeneXpert MRSA Test

Das Konzept des GeneXpert MRSA Testsystems überzeugte vor allem durch seine Schnelligkeit, die unübertroffene Einfachheit und die volle Automatisierung des Probenaufschlusses sowie der weiteren Testdurchführung ohne manuelle Schritte. Durch den hohen Automatisierungsgrad kann es auch außerhalb eines mikrobiologischen Labors ohne Fachkräfte zuverlässig betrieben werden. Die Aufarbeitung der Proben dauerte nicht mal eine viertel Stunde und der PCR-Lauf war nach 75 Minuten beendet, so dass das Ergebnis nach Abnahme des Abstrichs schon nach 90 Minuten vorliegt. Somit können bei Bedarf auch außerhalb der regulären Arbeitszeiten schnelle Einzelnachweise durchgeführt werden. Die Befunde des kulturellen Tests stimmen mit denen der PCR mit Ausnahme der Probe REG_19 überein. Dieser ist zwar bei der Auswertung negativ ausgefallen, bei genauerem Hinschauen aber war der CP-Wert höher als die normalen negativen Werte. Bei diskrepanten Ergebnissen im Vergleich zur Kultur müssen die dazugehörigen CPs kritisch betrachtet werden, da die Positiv-Negativ-Schwelle systemeigen festgelegt wird und die CPs sehr nahe beieinander liegen können. Die Materialkosten für einen Einzelnachweis sind mindestens 10mal höher als für den Kulturnachweis, allerdings müssen wesentlich geringere Personalkosten für die groß teils automatisierte Abarbeitung aufgewendet werden.

5.2.3 BD GeneOhm™MRSA Test

Bei diesem Test war das Lösen der Probe im Puffer, das Konzentrieren und Waschen und das anschließende Lysieren im Vergleich zum Roche-Test viel zeitaufwendiger (mindestens eine Stunde) und nicht besonders überschaubar.

Das Programm dagegen konnte sofort gestartet werden und war sehr anwenderfreundlich. Der Lauf wurde bestimmt und konnte sofort nach Eingabe der Anzahl der Proben, der Chargennummer und des Verfallsdatums gestartet werden und war nach etwa einer Stunde beendet. Anschließend hatte man sofort ersichtliche Ergebnisse, die farblich gekennzeichnet waren. Allerdings konnte man in dem durchgeführten Assay keine Kurven und somit auch keine CrossingPoints oder quantitative Ergebnisse für die Zielorganismen bestimmen. In die Blocks passten nur 14 Proben plus die Positiv-, und Negativkontrolle. Hatte man jedoch erheblich mehr Proben, dann war das Verfahren sehr zeitaufwendig. Sollten andererseits während des Laufs noch Positionen unbesetzt sein, könnten jederzeit auf den leeren Positionen neue Läufe gestartet werden, ohne dass der vorherige Lauf unterbrochen werden musste. Die Zeit, die durch die kurze PCR-Laufzeit gewonnen wurde, ging jedoch bei der

Probenaufbereitung verloren. Seit kurzem ist ein neues Lysat auf dem Markt, welches die Aufbereitungszeit und den Aufwand minimieren soll. Die Kosten bei diesem Diagnostikverfahren liegen etwas unterhalb derer des GeneXpert MRSA Tests.

5.2.4 LightCycler®MRSA Advance Test

Insgesamt gesehen hat sich der Roche LightCycler® MRSA Advanced Test in vielen Belangen als mindestens gleichwertig zum kulturellen Testsystemen erwiesen. In manchen Schritten (wie z.B. der zuvor dargestellten Probenextraktion und -lyse) erwies er sich auch als vorteilhafter im Vergleich zum Workflow des kommerziellen BD GeneOhm MRSA Testsystems.

Die Aufbereitung der Proben bis zum fertigen Lysat war sehr einfach und anwenderfreundlich. Schon innerhalb kürzester Zeit (20 Minuten) hatte man die DNA vorliegen und konnte fortfahren. Von Vorteil war, dass man an diesem Punkt die Lysate bis zu einem Monat einfrieren, für 6 Tage im Kühlschrank aufbewahren oder sofort mit dem Procedere fortfahren konnte. Das Handling mit den im Lysetube belassenen Tupferansätzen war etwas gewöhnungsbedürftig. Um an den Tupferspitzen mit der Pipette vorbeizukommen haben sich spezielle, besonders dünne und lange Pipettenspitzen als hilfreich erwiesen. Die Tubes waren außerdem so beklebt, dass es nur schwer ersichtlich war, wo der Tupfer, die Spitze oder der Flüssigkeitspegel liegt. Dennoch ist vor allem die Probenaufarbeitung sehr einfach gehalten und sehr schnell abzuarbeiten. Das Ansetzen des Mastermixes aus den fertig konfektionierten Kit-Reagenzien geht sehr schnell von der Hand und war unkompliziert. Die Software war sehr überschaubar und selbst für den ungeübten Nutzer leicht zu erlernen. Die Laufzeit des Runs war etwas länger als die des BD GeneOhm Tests, und betrug etwa 75 Minuten. Die Kosten entsprachen in etwa denen des BD GeneOhm™MRSA Tests.

5.2.5 PCR mit dem LightCycler 480

Dazu wurden die BD-Lysate verwendet und nach vollendeter Studie wieder aufgetaut, gevortext und kurz anzenrifugiert um für den Regensburger „Home-Brew“-PCR-Lauf verwendet zu werden. Das Lysat war somit schon vorbereitet und man konnte sich gleich dem nächsten Schritt, nämlich dem MasterMix, zuwenden. Jener ist bei dieser PCR im Vergleich zu den anderen Getesteten besonders aufwendig, weil die einzelnen Bestandteile pipettiert werden müssen und nicht bereits in einer gebrauchsfertigen Form vorliegen. Das Computerprogramm war dem des LightCycler Advance Tests sehr ähnlich und leicht zu bedienen. Die Laufzeit betrug bei diesem Verfahren etwa 80 Minuten und war somit die längste. Anschließend konnte graphisch die Amplifizierungsanalyse sowie die

Schmelzkurvenanalyse abgelesen werden. Diese Verfahren kann von den Kosten her mit den üblichen anfallenden Kosten für PCR-gestützte MRSA-Nachweise eingestuft werden.

5.3 Summarische Bewertung

Diagnostisches Verfahren	Sensitivität	Spezifität	Laufzeit	Kostenaufwand	Einfachheit der Anwendung
Kulturnachweis	100%	100%	24-72h	+	++
GeneXpert	90%	100%	75 min	+++	+++
BD GeneOhm	94%	100%	65 min	++	++
LightCycler® MRSA Advanced	100%	98,7%	75 min	++	++
Regensburger „in-house“ PCR Protokoll	100%	100%	80 min	++	++

6 Ökonomischer Aspekt

Im folgenden soll die Kosteneffizienz von PCR-gestützten Nachweismethoden für Krankenhäuser und Pflegeeinheiten kritisch überprüft werden.

Durch die konventionellen, kulturellen Nachweismethoden geht viel kostbare Zeit verloren, die möglicherweise zu unnötigen Isolierungsmaßnahmen, und -zeiten führt. Die heutzutage neu entwickelten PCR-Verfahren können mit Hilfe des Nachweises von *mecA* und *orfX* innerhalb kürzester Zeit MRSA nachweisen, ohne falsch-positive Ergebnisse durch eine Mischflora aus KONS oder MSSA zu liefern.²⁴ Sie weisen zudem mittlerweile eine Sensitivität von über 80% und eine Spezifität von über 93% auf.²⁵

Dennoch sind die PCR-gestützten Methoden immer noch teurer und nicht überall verfügbar. Oft sind die Laborkapazitäten limitierende Faktoren um größere Mengen an Abstrichen in einem reibungslosen Ablauf testen zu können. Außerdem muss auch die Logistik, die zeitnahe Abnahme und das Einschicken in die Diagnostikabteilung gewährleistet sein, um möglichst viele Proben auf einmal in einem PCR- Lauf zu testen.

Grundsätzlich ist vorerst das Festlegen eines Screening-Programms und entsprechender Screeningkriterien notwendig. Die Übertragungswahrscheinlichkeit von MRSA steigt mit der Länge der Liegedauer des kolonisierten Patienten, in der keine Isolierungsmaßnahmen durchgeführt werden. Bei einer MRSA-Infektion kommt es zu einer erhöhten Schwere der Erkrankung, zur steigenden Mortalität, zu einem verlängerten Krankenhausaufenthalt verbunden mit erhöhten Kosten durch eine MRSA-wirksame Therapie und nötigen Diagnostikmaßnahmen.⁸ Die Kosten für einen Liegetag eines MRSA-Patienten auf einer chirurgischen Intensivstation bewegen sich um etwa 1600€.²⁶ In Einrichtungen ohne Aufnahmescreening kann nur durch Überprüfung von Routineproben von z.B. Wunden ein MRSA-Nachweis erbracht werden. Dabei werden aber mindestens 50-80% der MRSA-Träger übersehen²⁷, die wiederum zu einem Risiko für die Zimmergenossen, das Personal und die Station werden. Um die Kosten des Screenings jedoch überschaubar zu halten, ist festzulegen, welche Patienten untersucht werden sollen. Das Robert-Koch-Instituts (RKI) empfiehlt das Screening von bestimmten Risikogruppen, die in Kapitel 3.2. bereits aufgeführt sind. Außerdem müssen die Zahl der Abstriche sowie die Abstrichsorte wie auch ggf. die Wiederholungsintervalle festgelegt werden, um damit eine hohe Sensitivität der Untersuchungen zu erreichen. Des Weiteren muss definiert werden, wie mit dem Patienten bis zum Vorliegen des Ergebnisses zu verfahren ist.⁹

Durch Implementierung eines derartigen Screenings von Risikopatienten ließ sich in Studien nicht nur die MRSA-Übertragung deutlich reduzieren, sondern auch die Rate an nosokomialen Infektionen drastisch um 50 bis 75% reduzieren.²⁸

Ähnliche Vorteile und der Rückgang von nosokomialen Infektionsraten sind auch an der Uniklinik Regensburg seit der frühen Einführung des PCR-gestützten MRSA-Screenings im Jahre 2004 dokumentiert zu beobachten.

Außerdem konnte die Kosteneffektivität derartiger Screeningmaßnahmen in mehreren Studien belegt werden.^{29,30}

Für die Einführung eines Screenings, welches den kulturellen Nachweis zur Diagnostik nutzte, wurden in einem Krankenhaus in Spanien pro Jahr 10.261€ für 214 Risikopatienten berechnet. Dabei wurden 37 neue Fälle von nosokomialer MRSA-Infektion aufgedeckt. Die Summe anfallender Kosten durch MRSA-Fälle belief sich pro Jahr auf 101.000€. Durchschnittlich war mit 2.730€ pro Infektion zu rechnen. Wenn durch das Screening-Programm mindestens vier MRSA-Infektionen verhindert werden können, lohnt es sich schon aus. Für den Kulturnachweis wurde mit 9,2-15,3€ gerechnet³¹, bei PCR-gestützten Methoden müsste man

mit etwa 10fach höheren Kosten für die Diagnostik rechnen (insgesamt fürs Screening-Programm geschätzte 29.170€). Doch auch hier würden schon 11 zu verhindernde MRSA-Infektionen ausreichen um kosteneffizient zu agieren.

In Holland wird eine sehr wirkungsvolle „search and destroy“-Kampagne gegen MRSA geführt. Die Inzidenzrate in den Niederlanden beträgt $< 0,5\%$, und ist somit ein Vorbild für andere Europäische Länder. Nur durch das sehr strikte Screeningprogramm gelang es am University Medical Centre Utrecht (UMCU) diese Zahlen aufrecht zu erhalten und den MRSA fast vollständig auszulöschen. In einer 10-jährigen Studie ist dargestellt, wie hoch die Kosten, die durch das Screening entstanden, waren, und wie hoch sie theoretisch gewesen wären, wenn kein Kontrollprogramm stattgefunden hätte. Die Kosten die mit der Kampagne anfielen, beinhalteten zusätzliche Materialkosten, wie sterile Kleidung, spezielle Medikamente, Diagnostikverfahren, Dekontamination und Schließung von Zimmern. Durch dieses Programm sind in den 10 Jahren 2.265 Behandlungstage für MRSA-befallene Patienten weggefallen, die Zimmer mussten 48 mal geschlossen werden, 29 medizinische Fachkräfte mussten zeitweise die Arbeit am Patienten einstellen und 78.000 zusätzliche Kulturen mussten angelegt werden. Die absoluten Kosten beliefen sich hiermit auf 2.800.000 Euro. Im nachgeahmten Falle ohne Screening würde das Krankenhaus mit einer steigenden Inzidenzrate für MRSA, Vancomycin-resistente Enterococci und VISA (Vancomycin-Intermediär-empfindliche *S. aureus*) rechnen müssen. Damit impliziert wäre eine verlängerte Liegedauer, ernsthaftere Infektionsausbrüche und langsamer verlaufende Heilungsprozesse mit höheren Kosten für die meist teureren Antibiotika. Die Kosten würden mindestens doppelt so hoch sein, wie in der derzeitigen Situation. Dieses Beispiel bestätigt, dass sich ein striktes und durchdachtes MRSA-Screening auf jeden Fall auszahlt.³²

Eine anderen Studie des Universitätsklinikums von Bern testete in einem Zeitrahmen von fünf Monaten das PCR-gestützte Nachweisverfahren GenoType MRSA Direct (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) in Hinsicht auf anfallende Kosten. In der Einrichtung betrug die MRSA-Rate schon in den letzten 10 Jahren $< 5\%$. 232 Patienten sind in dem Zeitraum gescreent, und teilweise bei bestehenden Risikofaktoren bis zum endgültigen Befund vorab isoliert worden. Durch den Mangel an freien Einbettzimmern sind nur die Patienten isoliert worden, die a) mit einem neulich entdeckten MRSA-Fall ein Zimmer geteilt haben oder b) die aus Regionen mit höherer MRSA-Rate kamen und weitere Risikofaktoren wie z.B. offene Wunden aufwiesen. Die Kostenanalyse beinhaltete die entstehenden Kosten durch die Nachweisverfahren und die Bereitstellung eines Einbettzimmers zur präemptiven Isolierung.

Nicht miteinbezogen wurden zusätzlich anfallende Kosten für medizinisches Personal und Material (Handschuhe, Kittel). Die Studie ergab, dass durch die Benutzung von PCR die Kosten weitaus höher waren, als die von konventionellen Kulturen, auch wenn nur der halbe (50€) anstelle des geläufigen Preises (100€) pro PCR gezahlt werden müsste. Die Kosten für das PCR-Screening aller Patienten beliefen sich auf 64.700€. Außerdem wurde parallel dazu eine Kultur für 11.455€ angelegt. Ersparnisse können dann mit den schnellen Nachweisverfahren erreicht werden, wenn die präemptiven Isolierungsmaßnahmen eingeleitet werden können. In diesem Fall konnten wegen der geringen Bereitstellung von Einbettzimmern nur bis zu 13% der gescreenten Patienten isoliert werden. Dadurch waren die Einsparungen in diesem Bereich relativ gering (23.900€). Wäre die Bandbreite der Isolierungen vollständig, käme es zu eminenten Einsparungen durch die schnellen PCR-Nachweise (103.320€). Berechnet wurde zum Vergleich auch der Fall, nur die 34 Patientenabstriche mit PCR-gestützten Methoden nachzuweisen, die zur präemptiven Isolierung ausgewählt worden sind, und die restlichen mit kulturellen Methoden nachzuweisen. Dabei ergaben sich Kosteneinsparungen von 15.450€.³³ Die Studie zeigt, dass die hohen PCR-Kosten bei einer geringen vorliegenden MRSA-Rate nicht wirklich kosteneffizient zu sein scheinen.

Eine kritische Evaluation des PCR-gestützten MRSA-Nachweises vor Gebrauch ist notwendig, um unnötige Kosten zu vermeiden. Dennoch können PCRs durch ihre Schnelligkeit und ihre mittlerweile hohen Sensitivitäten (90-100%) und Spezifitäten (93-99%) überzeugen. Außerdem sollte das höchste Ziel in Institutionen die schnelle Eindämmung des MRSA-Keimes sein, egal ob die MRSA-Prävalenz gering oder hoch ist. Das kontinuierliche Screening und die nötigen Hygienemaßnahmen sind dabei die ausschlaggebenden Faktoren.

7 Zusammenfassung

Seit den sechziger Jahren ist ein bisher unaufhaltsamer und stetig zunehmender Anstieg von MRSA auf der ganzen Welt zu verzeichnen. In Europa ist vor allem Deutschland von sehr hohen Zuwachsraten betroffen, wie eine Resistenzstudie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft 2004 feststellte. Zu diesem Zeitpunkt lag der MRSA-Anteil bei 22,6%³⁴. Dieser ist erfreulicherweise deutlich unter dem der USA, der bei 50% liegt.³⁵

Doch um diesen Trend umzukehren, sind sowohl therapeutische als auch krankenhaushygienische Ansätze von Nöten. Die strikte Einführung von Screenings und die

Entwicklung einfacher und preiswerter Testverfahren zur MRSA-Diagnostik sind sichere Maßnahmen zur Eindämmung des Anstiegs von MRSA-Infektionen.

Neuere kulturelle Verfahren mit chromogenen Selektivmedien liefern eine Sensitivität zwischen 60 und 95% und eine Spezifität von 99%. Schon nach 24 Stunden können oft entsprechende Ergebnisse vorliegen (Zeitgewinn von ca. einem Tag im Vergleich zu konventionellen Nährmedien wie z.B. Bluragarplatten), dennoch werden weitere 24 Stunden bei unklaren Ergebniskonstellationen erfordert. Zum eindeutigen Nachweis sind ggf, auch noch zusätzliche Bestätigungstests nötig. Somit ist und bleibt der kulturelle Nachweis der langwierigste. In unserer Studie ergab der kulturelle Nachweis sehr gute Ergebnisse von einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von ebenfalls 100%. Auf keinen Fall darf vergessen werden, dass das kulturelle Verfahren immer noch als Goldstandard angesehen wird.

Auch die PCR-gestützten Nachweisverfahren die wir testeten lagen mit ihren Ergebnissen im Durchschnitt des internationalen Vergleichs. Aktuelle Studien mit verschiedenen SCC*mec*-basierten Testsystemen ergaben Sensitivitäten von 90-100%, Spezifitäten von 93-99%, positive Vorhersagewerte von 80-95% und negative Vorhersagewerte von über 95%.³⁶

Von großem Vorteil gegenüber dem Kulturnachweis ist die schnelle Befundübermittlung von innerhalb 2-4 Stunden nach Abnahme des Abstrichs, so dass eine präemptive Isolierung von Risikopatienten effektiv durchgeführt werden kann. Die kulturelle Diagnostik wird trotz neuerer Entwicklungen durch das biologische Zeitfenster der Wachstumsgeschwindigkeit der Keime begrenzt bleiben. So werden dadurch frühestens nach acht bis zwölf Stunden erste aussagekräftige Ergebnisse vorliegen können.

Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Vorteil ist der finanzielle Aspekt. Die kulturellen Nachweisverfahren sind weitaus kostengünstiger als die mindestens 10-fach teureren PCR-Testsysteme.

Um den steigenden Trend der MRSA-Infektionen deutschlandweit einzudämmen, wäre ein Aufnahmescreening bei allen stationär aufgenommenen Patienten nötig. Schnelle PCR-gestützte Verfahren wären von Vorteil, um die kostenintensiven und umfangreichen Isolierungsmaßnahmen so effizient und so kurz wie möglich zu halten. Doch nicht alle Krankenhäuser sind mit diesen modernen Testverfahren ausgerüstet und vielerorts ist die Umsetzung eines Screenings mit der dazugehörenden Isolierung logistisch und aus Personalmangel nicht möglich.

Welche Methode letztendlich zum Einsatz kommt, ist Frage der Laborausstattung, des klinischen Patientenfalls und der zur Verfügung stehenden Gelder der Einrichtungen.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

- 1 <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/013-038.htm>
- 2 [King MD](#). Annals of internal medicine 7 March 2006; Vol 144 Issue 5; Pages 309-317.
- 3 Linde H J, Lehn N. Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Diagnostik. Dtsch Med Wochenschr 2005; 130: 582-585.
- 4 Kipp F, Friedrich AW, Becker K, Eiff Cv. Bedrohliche Zunahme MRSA-Stämme: Strategien zur Kontrolle und Prävention in Deutschland. Deutsches Ärzteblatt 2004; 101: 28-29.
- 5 Robert-Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin, 09.Februar 2007/ Nr. 6.
- 6 www.p-e-g.de
- 7 Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin: MRSA, 21.Oktober 2005/ Nr.42.
- 8 Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. Infect Control Hosp Epidemiol 2005;26:166–74.
- 9 Schwarz T, Gelbfieber-Impfstelle, Facharzt für Labormedizin, Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie, Würzburg; Redaktion medizin.de.
- 10 Zimmerli M, Widmer AF, Dangler M, Filippi A, Frei R, Meyer J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among dental patients: a problem for infection control in dentistry? Clin Oral Invest 2008; *online* 23.12.2008.
- 11 Weber JT. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 2005; 41: 269-272.
- 12 Kazakova SV, Hageman JC, Matava M, Srinivasan A, Phelan L, Garfinkel B, Boo T, McAllister S, Anerson J, Jensen B, Dodson Tenover FC, Cody S, Jernigan DB. A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. N Engl J med 2005; 352: 468-475.
- 13 Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet 2002; 359: 1819-1827.
- 14 Lina G, Piemont Y, Godail-Gamo F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29: 1128-1132.
- 15 Naimi TS, Le Dell KII, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynefield R. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA 2003; 290: 2976-2984.
- 16 Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikainen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. Emerg Infect Dis 2004; 10: 1627–34.

- 17 Kunori T, Cookson B, Roberts JA, Stones S, Kibbler C. Cost-effectiveness of different MRSA screening methods. *J Hosp Infect* 2002; 51: 189-200.
- 18 Roche: www.roche.com/pcr_d.pdf
- 19 Heusser R, Ender M, Berger-Bachi B, Mc Callum N. Mosaic staphylococcal cassette chromosome mec containing two recombinase loci and a new mec complex; B2. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 390-3.
- 20 Donnio PY, Oliveira DC, Faria NA, Wilhelm N, Le Coustumier A, de Lencastre H. Partial excision of the chromosomal cassette containing the methicillin resistance determinant results in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4191-3.
- 21 Rossney AS, Herra C.M., Brennan GI, Morgan PM, O'Connell B. Evaluation of the Xpert Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Assay Using the GeneXpert real-Time PCR Platform for Rapid Detection of MRSA from Screening Specimens. *Journal of Clin Microbiol* Oct 2008, Vol.46, No.10, p. 3285-3290.
- 22 Hagen RM, Segmüller I, Navai J, Kappstein I, Lehn N, Miethke T. Development of a real-time PCR assay for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples. *J Med Microbiol*. 2005; 295: 77-86.
- 23 Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM, Jr. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5578-5581.
- 24 Holfelder M, Eigner U, Turnwald AM, Witte W, Weizenegger M, Fahr A. Direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical specimens by a nucleic acid hybridisation assay. *Clin. Microbiol. Infect* 2006; 12: 1163–1167.
- 25 Geldner G, Ruoff M, Hoffmann HJ et al. Cost analysis concerning MRSA infection in ICU. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1999; 43: 409-413.
- 26 Lucet JC, Grenet K, Armand-Lefever L, Harnal M, Bouvet E, Regnier B, et al. High prevalence of carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission in elderly patients: implications for infection control strategies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 121-6.
- 27 Wernitz MH, Swidsinski S, Weist K, Sohr D, Witte W, Franke KP, et al. Effectiveness of a hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers at hospital admission to prevent hospital-acquired MRSA infections. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 457–65.
- 28 Girou E, Azar J, Wolkenstein P, Cizeau F, Brun-Buisson C, Roujeau JC. Comparison of systematic versus selective screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in a high-risk dermatology ward. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 583–7.
- 29 Karchmer TB, Durbin LJ, Simonton BM, Farr BM. Cost effectiveness of active surveillance cultures and contact/ droplet precautions for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2002; 51: 126–32.
- 30 Gavalda L, Masuet C, Beltran J, Garcia M, Garcia D, Sirvent JM, Ramon JM. Comparative Cost of Selective Screening To Prevent Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Compared With the Attributable Costs of MRSA Infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 1264-1266
- 31 Vriens M, Blok H, Fluit A, Troelstra A, van der Werken C, Verhoef J. Costs Associated with a Strict Policy to Eradicate Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Dutch University Medical Center: A 10-Year Survey. *Eur Infect Dis* 2002; 21: 782–786.

32 Bühlmann M, Bögli-Stuber K, Droz S, Mühlemann K. Rapid Screening for Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by PCR and Associated Costs. J Clin Microbiol 2008; Vol. 46, No. 7: 2151–2154.

33 Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Wichelhaus TA. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfung & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2004. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence, Rheinbach, Deutschland 2006.

34 Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahn DF. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*; 2005 status in the United States. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 5: 2.

35 Huletsky A, Lebel P, Picard FJ, Bernier M, Gagnon M, Boucher N, et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in less than 1 hour during a hospital surveillance program. Clin Infect Dis 2005; 40: 976–81.

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Durch *S. aureus* und MRSA verursachte Krankheitsbilder- Modifiziert nach Linde und Lehn³

Tab.2: Häufigkeit der Resistenz gegenüber weiteren Antibiotika bei MRSA aus Krankenhausinfektionen in Deutschland 2000–2006, basierend auf Einsendungen an das NRZ⁵

Tab. 3: Beispiele für Strategien des MRSA-Screenings am Universitätsklinikum Regensburg und der Medizinischen Hochschule Hannover (2005)⁷

Tab. 4: Sensitivität für den MRSA-Nachweis nach Abstrichsort⁷

Tab. 5: Auftreten der häufigsten Infektionen mit MRSA in verschiedenen klinischen Disziplinen, basierend auf Einsendung an das NRZ, 2005/2006⁵

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: REM-Aufnahme von MRSA bei 9560facher Vergrößerung; <http://static.guim.co.uk/sys-images/Guardian/Pix/pictures/2008/05/18/mrsa460.jpg>

Abb.2: Ein durch MRSA verursachter kutaner Abszess; http://www.jems.com/Images/mrsa_tcm16-33808.jpg

Abb.3: Begriffsbestimmungen zu MRSA⁵

Abb.4: Tupfer für Nasenabstrich (Fa. Copan), Fotodokumentation von O. Betcher

Abb.5: Abstrichorte für das MRSA-Screening an deutschen Universitätskliniken im Mai 2005 (n=36) *Eintrittsstelle von Kathetern, Sonden und Drainagen, Anus, Perineum, Leiste, Stirn-Haargrenze, Axillen und Hände⁷

Abb.6: *Staphylococcus aureus* auf Blutplatte; Klarmann D., Moss A., Schleuter G., MRSA bei Tieren, Laves Niedersachsen

Abb.7: Müller-Hinton Platte mit *S. aureus*, welcher eine eindeutigen Resistenz auf Cefoxitin und Oxacillin aufweist;

http://www.lg1.ch/cpg/albums/userpics/10001/normal_MRSA_totalresistent.jpg

Abb.8:Ablauf der PCR; <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif>

Abb.9: Vergleich von getrenntem Nachweis von *mecA*, *S. aureus* und koagulase negativen Staphylokokken (CoNS) und SCCmec basierten Testkonzepten. Die Primerkonstellationen sollen lediglich einen schematischen Vergleich der Testkonzepten ermöglichen. Reischl U, Holzmann T. Direct nucleid acid-based detection of MRSA in clinical specimens. J Lab Med 2008; 32: 253-265

Abb.10: SmartCycler Mini-Zentrifuge, Fotodokumentation von O. Betcher

Abb.11: SmartCycler Reaktionsgefäß, Fotodokumentation von O. Betcher

Abb.12: Analytische Auswertung der Probe REG_19; Auswertungsprogramm des GeneXperts

Abb.13: Analytische Auswertung der Probe REG_22; Auswertungsprogramm des GeneXperts

Abb.14: Schmelzanalyse des LightCycler®MRSA Advance Tests; Auswertungsprogramm des LightCycler®MRSA Advance Tests

Abb.15: Schmelzkurve des LightCyclers 480, Auswertungsprogramm des LightCyclers 480

9 Danksagung

Ich danke allen, natürlich auch den Patienten, die mich beim Schreiben und beim Werdegang der Arbeit unterstützt haben!

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater, PD Dr. Udo Reischl, für die Bereitstellung des Themas, der Ausstattung und der Räumlichkeiten bedanken. Die Arbeit an der Mikrobiologie hat mir richtig Spaß gemacht!

Auch bei meinem Betreuer Markus Bollwein muss ich mich von Herzen für sein stetig offenes Ohr und seine nützlichen Anregungen bedanken. Durch seine Ein- und Anführung habe ich es geschafft den praktischen Teil zu bewältigen.

Des weiteren war mir auch Silvia Förster oft eine Hilfe besonders, wenn es um das Auffinden von Materialien oder Dateien ging. Herzlichen Dank!

Auch meiner Freundin und Ex-Boxenpartnerin Silvia Grundei möchte ich an dieser Stelle besonders danken, weil sie mich zu diesem Thema gebracht hat.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Korrekturleserin Julia Stumpf und bei Frank Schmitt für die Einführung in Word bedanken.

Bei meinem Freund Stephan Abendschein möchte ich mich für die Geduld und Unterstützung während dem Schreiben bedanken.

Abschließend möchte ich meinen Eltern von Herzen danken, dass sie immer hinter mir stehen und mir meinen Werdegang als Zahnmedizinerin ermöglicht haben! Herzlichsten Dank!

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Olga Betcher
Geburtsdatum	07.08.1983
Geburtsort	Reichenau, Polen
Familienstand	Ledig

Schulbildung

1989-1993	Grundschule in Bad Neustadt
1993-2002	Rhöngymnasium Bad Neustadt
	Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

2003-2008	Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg
29.09.2005	Physikum, Gesamtnote „befriedigend“
20.07.08	Staatsexamen, Gesamtnote „gut“

Assistenzzeit

Seit September 2008	Angestellt in einer Zahnarztpraxis in Regensburg
Seit Juli 2009	Angestellt in einer oralchirurgisch orientierten Praxis in Neunburg vorm Wald

Promotion

Seit Oktober 2008	Am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Thema: Systematische Evaluierung von vier unterschiedlichen Real-Time-PCR-Nachweisverfahren für Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) im Vergleich zu modernen kulturellen Nachweisverfahren Betreuer: PD Dr. Reischl
-------------------	---

Regensburg, den 23.11.2009	Olga Betcher
----------------------------	--------------

11 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt".

Regensburg, den 23.11.2009

Olga Betcher