

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

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUM
DIREKTNACHWEIS VON METHICILLIN-
RESISTENTEN STAPHYLOCOCCUS AUREUS
(MRSA) AUS NASENABSTRICHTUPFERN MITTELS
PCR-GESTÜTZTER VERFAHREN UND
CHROMOGENER MEDIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silvia Grundei
2009

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

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUM
DIREKTNACHWEIS VON METHICILLIN- RESISTENTEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) AUS
NASENABSTRICHTUPFERN MITTELS PCR-GESTÜTZTER
VERFAHREN UND CHROMOGENER MEDIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silvia Grunde
2009

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichtersteller:

PD Dr. Udo Reischl

2. Berichtersteller:

Prof. Dr. Helmut Schweikl

Tag der mündlichen Prüfung:

21.10.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Staphylococcus aureus (S.aureus)	1
1.2	Methicillin - resistenter Staphylococcus aureus (MRSA)	4
1.3	Grundlagen angewandter MRSA-Nachweisverfahren	9
2	Fragestellung	13
3	Material und Methode	14
3.1	Studienaufbau	14
3.2	Vorraussetzungen zur Probenentnahm	14
3.2.1	Genehmigung der Ethikkommission	14
3.2.2	Patientenauswahl	15
3.2.3	Entnahmematerialien und Transport	16
3.3	Probenverarbeitung zur Diagnostik im mikrobiologischen Labor am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg	18
3.3.1	Materialien	18
3.3.2	Anlegen der Kulturen	19

3.3.3	Auswertung der Platten	20
3.3.4	Befund	22
3.4	Probenverarbeitung zur Diagnostik im molekularbiologischen Labor im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg	23
3.4.1	DNA-Isolierung	23
3.4.1.1	Materialien zur DNA-Isolierung	23
3.4.1.2	Extraktion des Abstrichmaterials	24
3.4.1.3	DNA-Isolierung durch den Magna Pure LC	25
3.4.2	PCR und Analyse durch den Lightcycler 480	26
3.4.2.1	Materialien	26
3.4.2.2	Herstellung der Master-Mix Lösung	27
3.4.2.3	Ablauf der der PCR	29
3.4.2.4	Analysen der Amplifikationskurven	30
3.4.2.5	Analysen der Schmelzpunkte	32
3.4.2.6	Analysen von Positiv- und Negativ-Kontrolle	33
3.4.3	Besonderheiten des LightCycler	34
3.4.4	Befundinterpretation	35
3.5	Statistische Auswertung	35

4	Ergebnisse	37
4.1	Ergebnisse aus den Kulturnachweisen	37
4.1.1	Mannit-Salz-Agar und Blutagar	37
4.1.2	CHROMagar™ MRSA	38
4.2	Ergebnisse aus dem Real-time PCR-Verfahren	43
5	Diskussion	45
5.1	Patientenproben	46
5.2	Kulturergebnisse	47
5.3	PCR-Ergebnisse	48
5.4	Vergleich der Kultur und der PCR-Nachweismethode	51
5.5	Kosteneffizienz	53
6	Zusammenfassung	55
7	Anhang	57
7.1	Quellenverzeichnis	57
7.2	Abbildungsverzeichnis	63
7.3	Tabellenverzeichnis	64
7.4	Abkürzungsverzeichnis	65

8	Lebenslauf	67
9	Danksagung	69

1. Einleitung

Die Entdeckung der Antibiotika zählt zu einer der größten Errungenschaften der Medizin des 20. Jahrhunderts. Doch deren weit verbreiteter und oft unkritischer Einsatz bringt auch Risiken mit sich. Schon bald nach Einführung der Antibiotika konnten resistente Keime beobachtet werden, die in der Lage waren, sich den angewandten Therapien zu entziehen. Zu den heute gefürchtetsten resistenten Erregern nasokomialer Infektionen zählt der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA).

1.1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Die grampositiven *Staphylococcus aureus* Organismen zählen zu den Katalase-positiven Kokken der Familie der *Micrococaceae*. Sie zeichnen sich durch eine kugelige bis ovale Form aus und treten im klinischen Probenmaterial meist als Haufenkokken auf.

Dieser Keim ist Teil der Normalflora von Mensch und Tier und zeigt beim Gesunden normalerweise keine Pathogenität. *S. aureus* besiedelt bevorzugt salzreiche Areale des menschlichen Körpers wie den Nasenvorhof, Leiste, Axilla oder Wundareale. Nicht selten tritt in der "gesunden" Bevölkerung eine kurzzeitige Besiedelung ohne äußere Anzeichen auf (asymptomatisches Trägertum) (45,3). Erst wenn sich die Immunitätslage des Trägers negativ verändert, kann sich der opportunistische Charakter dieses Keims in einer Infektion zeigen.

Die Virulenz des *S. aureus* beruht auf der Bildung verschiedener endogenen und exogenen Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren. Über ihren toxisch-infektiösen Charakter kann die Produktion solcher Pathogenitätsfaktoren zu einer Vielzahl von Krankheitsbildern beim Menschen führen. Dazu gehören:

- Alphatoxin: Abszessbildung durch membranschädigende Wirkung
- Leukocidin: Abszessbildung durch Zerstörung von Leukozyten
- Enterotoxin: Lebensmittelvergiftung
- Toxic-Schock-Syndrom-Toxin 1 (TSST1): stimuliert Zytotoxinausschüttung und kann das sogenannte Toxic-Schock-Syndrom auslösen
- Exfoliatine A und B: Auflösen von Zelladhäsionen, was zur blasenbildenden Dermatitis exfoliativa führt
- Protein A : Bindet Antikörper so, dass sie von Makrophagen unerkant bleiben

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

Tab.1: Durch S. aureus und MRSA verursachte Krankheitsbilder -
Modifiziert nach Linde und Lehn (25,14)

Durch die Einführung der Penicilline konnte die Ausbreitung von den Methicillin-sensiblen S.aureus (MSSA) stark eingedämmt werden.

1.2 Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA)

Innerhalb der Gruppe von nosokomialen Infektionen geht heutzutage die Gefahr weniger vom Methicillin-sensiblen Staphylococcus aureus (MSSA) aus, als vielmehr von den resistenten Stämmen, die sich unter Antibiotika-Selektionsdruck entwickeln konnten. Schon bald nach Einführung der Penicilline wurden β -Laktamase bildende Stämme beobachtet, die damit eine Resistenz entwickelt hatten. Man trat ihnen mit einem halbsynthetischen β -Laktamase-stabilen Antibiotika, dem Methicillin, entgegen. Doch Anfang der 60er Jahre wurde das erste Mal das Auftreten von Methicillin-resistenten Stämmen, genannt MRSA, beschrieben.

Der Resistenzmechanismus von MRSA 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, sodass eine Hemmung der Zellwandsynthese des S.aureus umgangen wird. Das PBP 2a wird vom mecA-Gen kodiert, dessen gezielter Nachweis auf Genomebene für die PCR-gestützte Diagnostik von MRSA genutzt werden kann.

Bei einem positiven Nachweis von MRSA sind nicht nur die Therapiemöglichkeiten entscheidend eingeschränkt, auch geht die Infektion mit einer schlechteren Prognose, einer erhöhten Mortalität und einem verlängerten Krankenhausaufenthalt einher (26).

Mittlerweile spricht man bei MRSA von einem multiresistenten Keim, der auch gegen andere Antibiotikaklassen wie Aminoglykoside, Licosamide, Makrolide, Tetracycline, Fluorochinolone, Sulfonamide,

etc. Resistenzen entwickelt haben kann (21, 37). Dadurch gestaltet sich die individuell anzuwendende Therapie als recht schwierig. Als Reserveantibiotikum gilt immer noch das Vancomycin – jedoch sind auch hier bereits einige "intermediär-empfindliche" Isolate beobachtet worden (sog. VISA). Die Entwicklung von Vancomycin-resistenten Keimen, die erstmals in Amerika beschrieben wurden, ist in diesem Zusammenhang besorgniserregend (21).

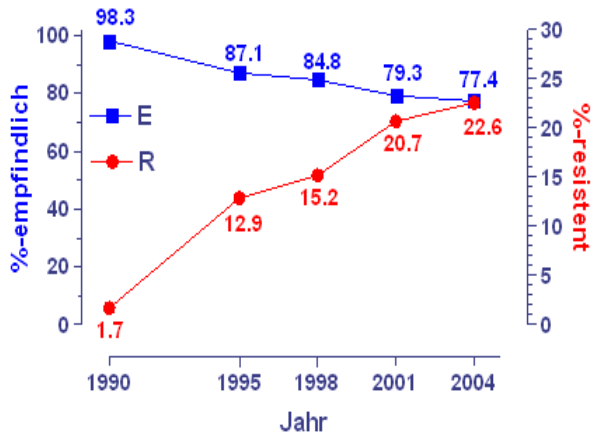
Die rasante Ausbreitung von MRSA entfacht in Fachkreisen immer wieder Diskussionen über Hygienemanagement und MRSA-Screening in Krankenhäusern und größeren medizinischen Einrichtungen. MRSA zählte ursprünglich zu den nasokomialen Infektionen, doch gerade in der jüngeren Vergangenheit traten Fälle von Infektionen außerhalb medizinischer Einrichtungen auf. Dieser fehlende Kontakt zu Krankenhäusern, sowie scheinbar nicht vorhandene Risikofaktoren sind typisch für den als cMRSA bekannten Erreger. Er ist in Deutschland jedoch noch selten, im Gegensatz zu den USA, wo das Aufkommen 2002/03 bei bis zu 20% lag. Allerdings zeigten nachträgliche Analysen der Region Regensburg, dass von 1995 bis heute ein stetiger Anstieg von caMRSA-Isolaten zu verzeichnen ist (39, 43, 24). Charakteristisch für caMRSA ist ein zusätzlicher Pathogenitätsfaktor, das Zellgift Panton-Valentine-Leukozidin (PVL). Multiple und rezidivierende Abszesse sind häufig die Folge und eine bei bis zu 37% der betroffenen Patienten letal verlaufende Komplikation ist die nekrotisierende Pneumonie (10). caMRSA zeichnet sich noch durch ein schmaleres Resistenzspektrum im Vergleich zu MRSA aus, was die Therapie allerdings nicht vereinfacht. Zur

Verbesserung der Behandlung sind momentan noch Therapiestudien nötig (24).

Die momentan weltweite MRSA Prävalenz ist nicht genau erfasst, doch geschätzte Zahlen zeigen einen sich weiter fortsetzenden Anstieg auf. Auch für Deutschland liegen momentan noch keine zuverlässigen Zahlen vor.

Betrachtet man die vorhandenen Daten, zeigen sich deutliche lokale Schwankungen abhängig von Region, Krankenhaus und auch einzelnen Stationen innerhalb der Krankenhäuser (21, 28). In Deutschland existieren mehrere Überwachungssysteme, die Daten zu nosokomialen Infektionen und Resistenzentwicklung zentral verwalten, darunter auch MRSA. Die Beteiligung der Krankenhäuser an diesen Projekten bleibt freiwillig und ist somit nur auf einen Teil beschränkt. Eine Datenerhebung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft zeigt einen stetigen Anstieg des MRSA Aufkommens bis auf 22,6% im Jahr 2004. Die statistischen Daten von 2007 sind noch in der Auswertung und sollen demnächst veröffentlicht werden (31)(Abb.1).

Staphylococcus aureus Oxacillin



Grenzwerte: Sensibel: ≤ 1 Resistent: > 1 mg/l (DIN 58940)
Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie: AG "Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz"

Abb.1: MRSA Prävalenz in Deutschland von 1990-2004

Aufgrund neuerer Daten von 2007 wird von EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) der europäische Trend so beschrieben:

In Ländern mit niedrigen MRSA Aufkommen kann eine Erhöhung der MRSA-Inzidenz verzeichnet werden. In Ländern mit höheren MRSA Aufkommen dagegen zeigt sich entweder ein Gleichbleiben oder sogar ein Rückgang der MRSA Inzidenz. Dazu gehört nach der EARSS auch Deutschland mit einem Abfall von 20 auf 16 % (11).

Es konnte auch festgestellt werden, dass ein großer Anteil der Patienten schon bei Aufnahme besiedelt war und den Erreger nicht erst im Krankenhaus erwirbt (29). MRSA –Prävention bedeuten deshalb eine rasche Identifizierung der MRSA- Träger, strikte hygienische Maßnahmen und Isolierungsmaßnahmen, um eine weitere Ausbreitung zu vermeiden.

Auch am Universitätsklinikum Regensburg haben sich Veränderungen in diese Richtung durchgesetzt. 2004 wurde das MRSA - Screening eingeführt. In Anlehnung der Empfehlungen des Robert-Koch-Instituts (36) werden dabei Risikopatienten auf MRSA untersucht, wobei zwischen Intensivstation und normaler Station unterschieden wird. Allein durch diese Maßnahme waren schon nach kurzer Zeit Erfolge zu verzeichnen, die sich heute - also nach einem Zeitraum von 4 Jahren mehr oder weniger konsequentem MRSA-Screening - eindrucksvoll bestätigen und auch statistisch dokumentieren lassen.

Die höchste Identifizierungsrate erzielt man natürlich durch ein generelles Screening aller Neuaufnahmen. Eine solche Maßnahme bedeutet jedoch auch einen deutlichen Mehraufwand an Zeit für Klinikpersonal und Laborpersonal sowie steigende Kosten. Deshalb ist eine solche Strategie nur begrenzt einsetzbar (6). Ein selektives Aufnahme- Screening dagegen spart Kosten und zeigt dennoch Effizienz (44). Als positives Beispiel einer konsequenten „search and destroy“ Politik zählen die Niederlande und die Skandinavischen Länder mit einer MRSA Prävalenz von rund 1% (21). Im Gegensatz dazu stehen Südeuropäische Länder mit bis zu 40%, oder Deutschland

mit durchschnittlich 20%, wobei lokale Schwankungen zu berücksichtigen sind.

1.3 Grundlagen der angewandten MRSA- Nachweisverfahren

Methoden, die zum Nachweis von MRSA genutzt werden, sollten idealerweise eine hohe Sensitivität sowie Spezifität zeigen und das Ergebnis innerhalb kürzester Zeit liefern können, um auch auf Seite der Klinik zeitnah auf den mitgeteilten Befund reagieren zu können (9). Zum Nachweis von MRSA haben zwei Verfahren in der heutigen Routine ihren Platz gefunden.

Zum einen der kulturelle Nachweis, wobei hier Bakterien entweder direkt oder nach Anreicherung von einem Abstrichtupfer auf entsprechenden Nährmedien angezüchtet und phänotypisch differenziert werden. Hierbei unterscheidet man grundsätzlich zwischen selektiven und nicht-selektiven Medien. Zum Erstgenannten zählt der in der Routine verwendete Columbia Agar, ein Blutagar. Auf den angelegten Kulturen wächst in der Regel ein breites Spektrum an Bakterienspezies aus dem klinischen Untersuchungsmaterial, wobei MSSA- bzw. MRSA- Kolonien durch ihr charakteristisches Aussehen und eine Reihe von biochemischen und biophysikalischen Tests identifiziert werden (β -Hämolyse, Katalaseaktivität, Koagulaseaktivität, spezifische Tests.). Die vorhandenen Resistenzen werden in der Regel durch einen Agardiffusionstest mit Antibiotikaplättchen ermittelt. In diesem Zusammenhang sollte festgehalten werden, dass der

konventionelle kulturelle Nachweis nach wie vor als Goldstandard in der MRSA Diagnostik betrachtet wird.

Zu den teil-selektiven Medien zählen mit Mannit angereicherte Platten. In diesem salzhaltigen Milieu können nur bestimmte Keime wachsen, darunter auch MRSA. Doch zur eindeutigen Bestimmung, muss dennoch die Reihe an phänotypischen Identifikationstests durchgeführt werden.

Selektive Medien, wie die neueren chromogenen Nährmedien, erlauben, zumindest nach den Angaben der Hersteller, MRSA-Keimen ein selektives Wachstum auf den Platten. Die Kolonien sollen dabei allein durch eine typische Farbe zu erkennen sein, die durch die Verstoffwechslung von chromogenen Stoffen entsteht. Der Vorteil, den diese Medien mitbringen sollen, ist eine kürzere Kultivierungsdauer. Bei nicht selektiven Medien beträgt die Zeit bis zum Befund 48-72 Stunden, welche durch chromogene Medien auf 24 Stunden verkürzt werden soll.

Ein weitaus schnelleres Verfahren zum MRSA- Nachweis ist das PCR-Verfahren. Die Grundlage liegt in dem für die Methicillin- Resistenz verantwortlichen *mecA* –Gen. Dieser Genabschnitt codiert das PBP 2a. Diese Gen-Sequenz ist Teil einer sogenannten Kasette, die als SCCmec bezeichnet wird und immer zwischen dem *S.aureus*- Genom und einer Sequenz, genannt *orfX*, liegt. Von dieser SCCmec Kasette existieren, nicht zuletzt aufgrund der natürlichen Variabilität und der genetischen Mobilität dieses Sequenzelements, mehrere Typen und Untertypen, wobei die bei uns in Europa vorkommenden und damit für

die Diagnostik relevanten Typen mit SCCmec Typ I bis V bezeichnet werden (33). In den ursprünglichen Testkonzepten fand der mecA-Nachweis noch getrennt von einer S.aureus Identifizierung statt. Doch da koagulase-negative Staphylokokken (KONS) in ca. 80 % der Fälle auch eine Methicillin-Resistenz – und damit auch das mecA Gen - aufweisen, konnte im Fall einer Doppelbesiedelung des Patienten mit KoNS und MSSA und ein falsch positives PCR-Ergebnis für MRSA nicht ausgeschlossen werden. Deshalb findet in den neueren PCR-Testsystemen ein gezielter Nachweis einer integrierten SCCmec Kasette in das S. aureus Bakteriengenom statt (33,34,30).

Die PCR- Diagnostik basiert auf der Identifizierung und anschließenden Amplifizierung eines durch eine Sonde gesuchten Genabschnittes. Aus den zu untersuchenden Proben wird zuerst die gesamte DNA isoliert. 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 zusammengeführt. Die Polymerase-chain-reaktion besteht grundsätzlich aus drei Schritten (Abb.2):

1. Das Gemisch wird zuerst zur Denaturierung der DNA Stränge auf 95°C erhitzt.
2. Danach erfolgt durch Abkühlen auf ca. 55°C die Hybridisierung von komplementären Primern bzw. Sonden an das entsprechende DNS-Segment mit komplementärer Sequenz.

3. Durch einen erneuten Temperaturanstieg wird die Polymerase aktiv und ergänzt den Einzelstrang mit Nucleotiden zu einem neuen Doppelstrang.

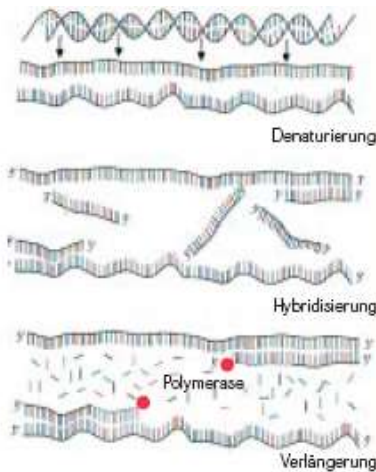


Abb.2 Ablauf einer PCR(35)

Diese Abfolge wird mehrfach wiederholt, sodass am Ende Millionen Kopien des von den Primersequenzen flankierten DNA- Abschnittes vorliegen. Durch fluoreszierende Sonden und die Messung der Fluoreszenzintensität im Reaktionsgefäß kann der Vorgang in Echtzeit verfolgt werden und wird deshalb als Real-Time-PCR bezeichnet (35).

2. Fragestellung

Da sich die Ausbreitung von MRSA als ein immer dringenderes Problem darstellt, sind neue diagnostische Strategien gefordert. Der Bekämpfung durch eine konsequente Therapie muss immer erst eine schnelle und eindeutige Diagnostik vorausgehen. In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Modelle entwickelt und rationale Kriterien festgelegt, nach denen entschieden werden kann, welche Patienten auf MRSA untersucht und welches Diagnostikverfahren dabei angewandt werden sollte. Wie schon vorher erwähnt, haben sich zwei Verfahren in der angewandten MRSA Diagnostik durchgesetzt.

Für welches Nachweisverfahren sollte man sich jedoch in welchem Fall entscheiden? Welche Unterschiede zeigen sich in der analytischen Sensitivität, Spezifität und der Zeit bis zur Übermittlung des Ergebnisses? Doch nicht allein die Effizienz entscheidet vielerorts über den Einsatz, sondern auch die Kosten. Die "diagnostischen Werkzeuge" müssen deshalb auch auf ihre Ökonomie hin überprüft werden. Welche Art der Diagnostik liefert welche Qualität der Ergebnisse und verursacht welche Kosten? Sind sie trotz entsprechender Kosten unbedingt nötig? Die in den folgenden Abschnitten beschriebene Studie versuchte diesen Fragen nachzugehen, indem traditionelle kulturelle Diagnostikverfahren mit einer PCR-Methode verglichen wurden.

3. Material und Methode

3.1 Studienaufbau

In unserer Studie wurden über einem Zeitraum von 4 Monaten 175 Patienten des Universitätsklinikums Regensburg und des Krankenhauses Barmherzige Brüder auf MRSA untersucht. Dafür wurde nach Einwilligung des Patienten jeweils ein Nasenabstrich durchgeführt, der am gleichen Tag im Institut für Mikrobiologie des Universitätsklinikums Regensburg zur Diagnosesicherung weiterverarbeitet wurde. Von jedem Abstrich wurden jeweils Kulturen auf drei verschiedenen Nährmedien angelegt und ein PCR- Nachweis am LightCycler 480 durchgeführt. Die beiden Methoden wurden anschließend in ihren Ergebnissen, ihrer Durchführungsdauer und den resultierenden Kosten miteinander verglichen.

3.2 Voraussetzung zur Probenentnahme

3.2.1 Genehmigung der Ethikkommission

Vor der Durchführung der Studie wurde vom Studienleiter ein Ethikantrag gestellt. Nach dessen Prüfung durch die hiesige Ethikkommission wurde ein positives Votum erteilt.

3.2.2 Patientenauswahl

Im Universitätsklinikum Regensburg wurde das Screening von Risikopatienten im Jahr 2004 eingeführt. Die dabei festgelegten Indikationen, die zur Aufnahme ins MRSA Screening-Programm führen, wurden an die vom Robert-Koch–Institut herausgegebenen Empfehlungen angelehnt (36). Zu den Risikogruppen zählen:

- Patienten mit bekannter Infektion mit multiresistenten Erregern (MRE)
- MRSA-Kolonisation/-Infektionen im Zeitraum eines Jahres vor Aufnahme und keine Dokumentation von drei negativen Abstrichen
- Patienten aus Einrichtung mit hoher MRSA-Trägerrate kommend
- Zuverlegungen aus externen Kliniken oder anderen Behandlungseinrichtungen, wenn der Patient innerhalb des letzten Jahres stationär war
- Kontakt zu MRSA- Patienten

In der Studie wurden Patienten nach verschiedenen Risikofaktoren ausgewählt, welche jedoch aufgrund der Anonymisierungsaufgaben des Ethikvotums nicht dokumentiert festgehalten werden durften. Faktoren waren u.a. Patienten mit schon bekanntem MRSA, Patienten, die an anderen Infektionskrankheiten litten, Patienten, die aus dem Altersheim zuverlegt wurden und Patienten, die aufgrund ihrer Multimorbidität untersucht wurden. Die restlichen Patienten fielen unter "sonstige Risikofaktoren", die oben aufgelistet sind.

Die Patienten wurden vor dem Screening mündlich und schriftlich über die Zielsetzungen der Studie aufgeklärt, worauf sie zur Einwilligung ein Aufklärungsformular unterschreiben mussten. Von den Patienten wurde Name, Geburtsdatum, Station und Abnahmedatum festgehalten.

3.2.3 Abstrichmaterial und Transport

Für den Nachweis von MRSA – Erregern besteht die Möglichkeit Material an verschiedenen Körperstellen wie Nase, Wunde, Haut, Leiste oder Rachen der Patienten zu entnehmen. Einer der günstigsten Abstrichorte ist der Nasenvorhof. Allerdings wurde gezeigt, dass dabei nicht alle MRSA-Fälle aufgedeckt werden (5). Durch eine Kombination von Nase und vorliegender Wunde konnte dagegen die größte Sensitivität erreicht werden (Abb.3) (38).

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	-

Abb.3 Sensitivität für den MRSA-Nachweis nach Abstrichort (38)

In der vorliegenden Studie wurden nur Abstriche der Nase durchgeführt. Das konventionelle Transportgefäß für den trocken angewandten Tupfer beinhaltet ein Stuart- Medium. Stuart-Medium wird häufig als Transportmedium verwendet und besteht aus 0,3 % Agar, Na-thioglycolat, Calciumchlorid, Natriumglycerolphosphat und einem Methylenblauzusatz. Für den Abstrich wurde sehr auf einen hygienischen Umgang mit den Patienten geachtet. Als besondere Hygienemaßnahmen wurden immer Kittel und Handschuhe verwendet. Bei schon bekannten MRSA- positiven Patienten wurde zusätzlich ein Schutzkittel, Mundschutz und Kopfhaube getragen und nach Verlassen des Zimmers wurden die Hände desinfiziert. Der Tupfer wurde in einem feuchten Medium transportiert, mit einer Labornummer gekennzeichnet

und am selben Tag ins Labor gebracht, sodass das Material innerhalb der vorgegebenen 24 Stunden weiterverarbeitet werden konnte.

3.3 Probenverarbeitung zur Diagnostik im mikrobiologischen Labor am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg

3.3.1 Materialien

Nährmedien:

- Blutagar: Colombia Agar Base, VWR 1.10455
- Mannit-Salz- Agar, VWR , 1.05404
- CHROMagarTMMRSA , Mast Diagnostica MR 502

Antibiotikaplättchen:

- Gentamicin (GM) 10µg, BD Nr.231299
- Aztreonam 30 µg (ATM), BioMérieux Nr.54752
- Ciprofloxacin 5 µg (CIP), BD Nr.231658

Drahtösen zum Ausstreichen, Neolap Nr.333100030

Pinzette, Roth Nr.2689.1

Gasbrenner ,Roth, Nr. H 703.1

3.3.2 Anlegen der Kulturen

Nach dem Eintreffen der Proben im Eingangslabor wurden ihnen Labornummern zugeteilt. Diese und das Anlegedatum wurden auf den Agar-Platten vermerkt. Die angewandten Kulturverfahren unterscheiden sich nur marginal von der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Bakteriologie, am hiesigen Universitätsklinikum. Zu den sonst verwendeten Mannit-Agar-Platten und Blutagarplatten wurde in der Studie zusätzlich eine CHROMagar™-Platte beimpft. Die Platten wurden jeweils in der Drei-Ösen-Technik ausgestrichen. Auf die Blutagarplatte wurde zusätzlich ein Ciprofloxacin-Antibiotikaplättchen sowie ein Aztreonam-Plättchen aufgelegt, auf das Mannitol-Agar ein Gentamicin-Plättchen.

Die Blutagar-Platte ist kein Selektivmedium, sodass darauf viele verschiedene Bakterien wachsen können. Das Antibiotikaplättchen dient der Wachstumshemmung von gramnegativen Keimen sowie Ciprofloxacin-sensitiven Staphylokokken.

Die Mannit - Platte enthält eine leicht erhöhte Salzkonzentration, welche ausreicht, um viele Keime am Wachsen zu hindern. So dient sie als Selektivmedium für Staphylokokken. Das Gentamycin-Plättchen verhindert dazu das Wachstum von gramnegativen Stäbchen.

CHROMagar™MRSA gehört zu den neueren Selektivmedien, welche speziell zur MRSA Diagnostik entwickelt wurden. Es hat sich in mehreren Studien mit einer hohen Sensitivität und Spezifität nach 24 Stunden bewährt (40, 41, 14). Aufgrund einer speziellen

Nährbodenzusammensetzung kann MRSA spezifisch und auch visuell über eine typische Farbreaktion leicht erkannt werden.

Die Platten wurden im Brutraum bei 36 °C für 48 Stunden gelagert.

3.3.3 Auswertung der Platten

Die Ergebnisse des Kulturwachstums wurden das erste Mal nach 24 Stunden und ein weiteres Mal nach 48 Stunden abgelesen. Das Ablesen wurde von Mitarbeitern der Routinediagnostik durchgeführt.

Die Auswertungen der Blutagar-Platte und der Mannit-Platte wurden zu einem Ergebnis zusammengefasst. Dabei hielt man zum einen fest, ob und in welchem Maße ein Wachstum von S.aureus und KONS zu beobachten war. (+++=sehr viel Wachstum; ++=viel Wachstum; +=mäßig Wachstum; (+)=wenig Wachstum). Zum anderen wurde überprüft, ob es sich bei den S.aureus Kolonien um MRSA handelte. Die Platten wurden darauf in mehreren Schritten getestet.

1.Farbe der Kolonien: Auf dem Blutagar sind gelb und weiß wachsende Kolonien S.aureus verdächtig. Auf Mannit zählen gelbe Kolonien als MRSA verdächtig.

2.Positive Hämolyse: Eine β -Hämolyse lässt sich oft nicht schon nach 24 Std erkennen.

3.ATM- Plättchen: Daran wachsende Kolonien deuten stark auf gram-positive Kokken hin.

4.Ciprofloxacin- und Gentamycin- Plättchen: Da bei MRSA oft eine Resistenz gegen Aminoglycoside und Gyrasehemmer mit einhergeht, gelten daran wachsende Kolonien als verdächtig.

5.Katalasereaktion: Mit H_2O_2 wird eine Katalasereaktion provoziert, welche auf Staphylokokken hindeutet.

6.Staphaurex®: Latexagglutinationstest zum Nachweis von S.aureus. Dafür löst der für S.aureus typische Clumping-Faktor dem zellwandständigen Protein A eine Gerinnungsreaktion mit dem im Test-Kit enthaltenen Fibrinogen aus. Dieses ist zur besseren Visualisierung an Latexpartikel gebunden.

7.Oxacillin-Resistenz: Getestet mithilfe einer geteilten Mueller- Hinton-Platte, wobei eine Hälfte eine erhöhte NaCl- Konzentration besaß und mit Oxacillin versetzt war. Die Platte wurde bei 30 °C über Nacht bebrütet. Resistente Keime wie MRSA wachsen auf beiden Seiten.

8.Antibiotikaresistenzen: Zuletzt wurden die verdächtigen Kolonien nach den Richtlinien des NCCLS auf ihre unterschiedlichen Resistenzen getestet. Hierbei wurde ein Agardiffusionstest auf einer Mueller- Hinton- Platte durchgeführt der mit verschiedenen Antibiotikaplättchen versehen war. Die Platte wurde über Nacht bei 36°C bebrütet. Die Auswertung erfolgte in Abhängigkeit vom Durchmesser des entstandenen Hemmhofes um die Plättchen. Dabei unterschied man zwischen E= Empfindlich, I= Intermediär und R= Resistent.

Im Gegensatz dazu wurde die CHROMagar™-Platte auch quantitativ untersucht. Nach 24 Stunden wurde zum einen festgehalten, wie viele Kulturen insgesamt gezählt werden konnten und zum anderen, wie viele davon als MRSA identifiziert wurden. Die Platten wurden dafür im Rahmen der Routinediagnostik abgelesen. MRSA- Kolonien zeigen sich nach Herstellerangaben als malven-/ rosafarben, im Gegensatz dazu werden andere Keime als farblos oder gelb sichtbar.

Nach 48 Stunden wurde das zweite Mal abgelesen, wobei man hier nur die Anzahl der malven-/rosafarbenen Kolonien festhielt. Zur Absicherung des Ergebnisses wurde an den verdächtigen Kolonien der S. aureus-spezifische Latex- Agglutinationstest Staphaurex® durchgeführt.

3.3.4 Befund

Sobald ein eindeutiges Ergebnis durch Kultivierung auf der Mannit- und Blutagarplatte vorlag, wurde ein Abschlussbefund für den Patienten erstellt. Dieser enthielt den MRSA- Status und die Ergebnisse der Resistenztestung.

3.4 Probenverarbeitung zur Diagnostik im molekularbiologischen Labor am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg

Mithilfe neuerer PCR– Technologie wurde ein weiterer MRSA-Nachweis durchgeführt, der im Vergleich zum konventionellen Kulturnachweis in kürzerer Zeit durchführbar ist. In diesem Fall fand eine Real- time PCR (=Echtzeit PCR) statt. Diese lässt zu, dass man mithilfe von fluoreszierenden DNA-Sonden den Amplifizierungsverlauf nach Detektion spezifischer Targets mitverfolgen kann.

3.4.1 DNA- Isolation

3.4.1.1 Material zur DNA- Isolation

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien :

- S.E.T.S. (Swab Extraction Tube System) Cat.No.:3 315568, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland bestehend aus einem:
 - o Innengefäß mit Schnappdeckel und Loch am Boden
 - o Außengefäß mit Schraubdeckel als Reaktionsgefäß
- Lysostaphin 5mg/ml
- 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.

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

3.4.1.2 Extraktion des Abstrichmaterials

Vor der eigentlichen DNA-Isolierung, die automatisiert ablief, musste die eingetroffene Probe manuell aufbereitet werden. Der Abstrich wurde mithilfe des Engel- Lötters von seiner Halterung abgetrennt und in das S.E.T.S. Innengefäß, das im Außengefäß steckt, eingebracht. Das Innengefäß wurde gut verschlossen und das Ganze darauf für 1 Minute bei 4400 rpm zentrifugiert. Anschließend konnte das Innengefäß mit dem Tupfer verworfen werden. Das Zentrifugat befand sich nun im Außengefäß.

Hierzu wurden nun 230µl Bacteria Lyse Buffer hinzugefügt, welches die Zellen zerstört, um die DNA leichter isolieren zu können. Zur Unterstützung der lysierenden Wirkung kommen die Proben für 1 Minute in den Vortex.

10 µl Lysostaphin wurden weiter hinzugegeben, ein spezifisches Enzym, das eine Lyse der Bakterienzellwand von Staphylokokken bewirkt und damit die Ausbeute für die DNA-Isolierung erhöht. Die Proben wurden für mind. 10 Min auf 37°C im Thermomixer erhitzt.

Nach kurzem Herunterzentrifugieren wurden 20µl Proteinase K hinzugefügt, welche die Aufgabe hat, die Proteinkomponenten des verbleibenden Zell-Lysats proteolytisch zu verdauen. Die Proben wurden erst für mind. 10 Min auf 65°C und anschließend zur vollständigen Inaktivierung der Proteinase K ein weiteres Mal für mind. 10 Min auf 95°C erhitzt.

3.4.1.3 DNA-Isolierung durch den MagNa Pure LC

Die Proben waren nun soweit aufbereitet, dass sie in den MagNa Pure überführt werden konnten, wo die endgültige Aufreinigung der isolierten DNA stattfand. Das Gerät musste davor mit Elution Tubes (2 ml) und Elution Tube Caps bestückt werden, die zuvor mit Labornummer und Datum beschriftet wurden. Weiter wurde ein MagNA Pure Compact Tip Tray, welches 3 Pipetten beinhaltet, und das Nucleic Acid Isolations

Kit I, welche in Fächer abgegrenzte Reaktionskomponenten enthält, eingesetzt.

Jeder Lauf beinhaltete zusätzlich eine Negativ-Kontrolle, um Verunreinigungen und eventuelle Kontaminationen aufzuzeigen und eine Positiv-Kontrolle, um eventuelle Pipettierfehler bei der Herstellung der PCR-Reaktionsgemische deutlich zu machen.

Um den MagNa Pure zu starten, musste das entsprechende Programm am Gerät gewählt werden. Nach ca. 30 Min war die DNA- Isolierung mit dem MagNA Pure Compact beendet. Das Eluat, das sich nun in den Elution Tubes befand, wurde nun entnommen und gut verschlossen.

3.4.2 PCR mit dem LightCycler® 480

3.4.2.1 Materialien für die PCR

Verbrauchsmaterialien und Reagenzien :

- LightCycler® DNA Master HybProbe
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96
- Pipetten

Geräte:

- Centrifuge 5804, Eppendorf, No.580400352
- LightCycler®480

3.4.2.2 Herstellung der Master-Mix Lösungen

Um MRSA in der Probe durch eine PCR nachweisen zu können, müssen die dafür benötigten, reaktiven Komponenten in einer Master-Mix-Lösung (MIX1) zusammengeführt werden.

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 vermischt. Bei mehreren Proben, dazu zählt auch die immer mitgeführte Positiv und Negativ- Kontrolle, mussten die Mengen um das entsprechende vervielfacht werden.

Zusätzlich fand bei jeder Probe ein quantitativer PCR Nachweis des humanen β-Globin-Gens statt. β- Globin ist Teil des menschlichen Hämoglobins und somit in jeder menschlichen Zell-DNA verschlüsselt. Der Nachweis dient der Qualitätskontrolle. Zum einen kann eine Inhibition erkannt werden, d.h. ob etwas wie Nasensalbe oder Ähnliches eine Inhibitionsreaktion herbeigeführt hat. Dafür wird der späteren Amplifizierungskurve entnommen, ob die quantitativen Werte in dem für β-Globin charakteristischen Bereich liegen.

Der andere Grund ist die Kontrolle des Abstrichs. Denn gleich 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 werden 7,2µl H₂O, MgCl 2,4µl, 0,25µl Beta-LCF, 0,5µl β-Globin 339r, 1,33 µl Beta- HP3, 1,33µl Beta- HP4 und 2µl LC Fast Start.

Die Proben werden für jeden Master- Mix einmal angesetzt. Dafür pipettiert man 15 µl der jeweiligen Master- Mix Lösung in die Vertiefungen der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96. Dazu kommen jeweils 5 µl des DNA- Isolats.

Für die Positiv Kontrolle werden 5µl verdünnter MRSA- DNA hinzugefügt.

In der Negativ -Kontrolle fehlt DNA- Eluat.

Die befüllte Platte wird mit einer speziellen Folie verschlossen und danach für 2 Minuten bei 1500xg zentrifugiert. Die Proben sind nun soweit, dass sie in den LightCycler eingelegt werden können, wo die PCR stattfindet.

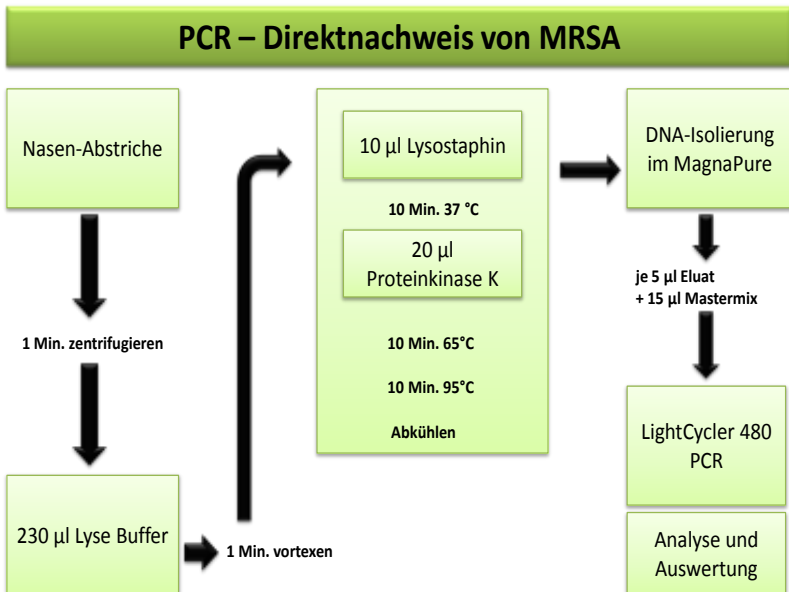


Abb.4 Übersichtsschema des PCR - Direktnachweises

3.4.2.3 Ablauf der PCR

In dem Versuch wird eine Hot-Start Polymerase verwendet. Diese hat die Eigenschaft, dass ihre Aktivität bei normalen Temperaturen blockiert wird, um eine frühzeitige Reaktion zu verhindern. Dadurch wird die Polymerase steuerbar. Um die Blockade aufzuheben, findet vor Beginn der PCR eine 10-minütige Denaturierungsphase statt, in der auf 95 °C erhitzt wird. Die Hitze bewirkt zusätzlich die Denaturierung der DNA, sodass sie in Einzelsträngen vorliegt.

Die "Cycling"-Phase beginnt mit 10 s bei 95°C und wird anschließend auf 55°C herabgekühlt, um diese Temperatur 10 s zu halten. Hier findet die Fluoreszenz- Messung bzw. Detektion statt.

Es folgt ein erneuter Temperaturanstieg auf 72°C, der für 12 s gehalten wird, bevor erneut auf 95°C erhitzt wird. Dann beginnt der Zyklus von neuem.

Der Zyklus wird im gesamten Lauf 50 Mal wiederholt.

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

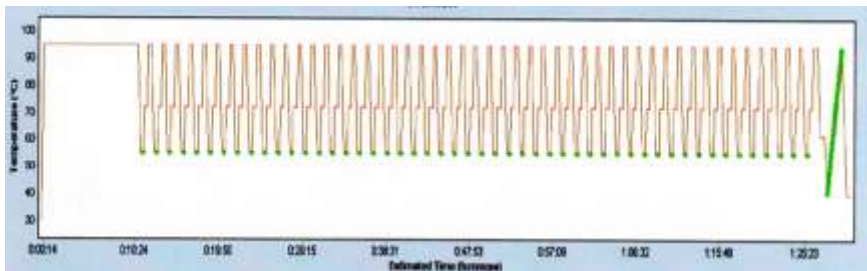


Abb.5 PCR -Temperaturzyklus im LightCycler 480

3.4.2.4 Amplifikationsanalyse

Die Amplifikationsanalyse findet in der Cycling- Phase statt. Im MIX1 befinden sich so genannte HybProbes, die als fluoreszierende Sonden

fungieren. Dabei trägt eine Sonde am 5'-Ende ein Fluorescein Farbstoff, die andere einen Farbstoff genannt RedX. Die Target-Regionen der Sonden liegen benachbart. 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 Fluorescein-markierungen der Sonde 1 mit Licht der Wellenlänge von 530 nm an. Sobald die beiden Sonden nebeneinander auf 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 640nm emittiert, das im LightCycler Gerät quantitativ und für jede Reaktionskapillare getrennt gemessen wird. Kann nur eine von beiden Sonden binden, wird Licht einer anderen Wellenlänge abgegeben, das aber für unsere Zwecke als unspezifisch galt und auch nicht detektiert wurde.

Die graphische Aufzeichnung ergibt für das *mecA*- Gen sowie für den β -Globin-Nachweis einen deutlichen linear-logarithmischen Anstieg. Der Cp-Wert gibt denjenigen PCR-Zyklus an, bei dem der erste Anstieg der Kurve zu verzeichnen ist. Für den β -Globin- Nachweis sollte der Cp-Wert zwischen 15-37 liegen, um als positiv zu gelten. Für den *mecA*-Gen Nachweis sollte der Cp-Wert unter 34 liegen. Die Unterscheidung zwischen *S. aureus* und Spezies erfolgt über die Schmelzkurvenanalyse.

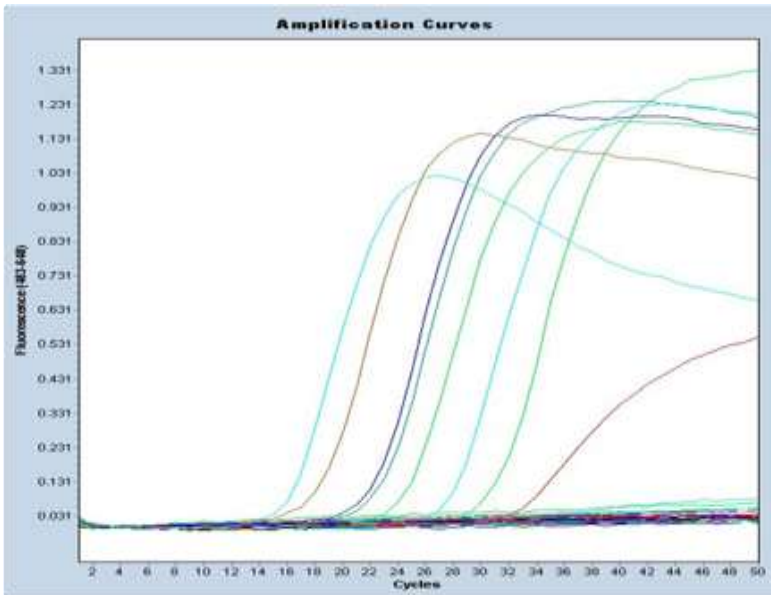


Abb.6 Amplifikationskurven mit linear-logarithmischem Anstieg

3.4.2.5 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse findet während des letzten Temperaturanstiegs statt, am Ende des Laufs. Dabei wird während der gesamten Zeit des kontrollierten Temperaturanstiegs im Reaktionsgefäß die Fluoreszenz gemessen. Die endgültige Unterscheidung zwischen *S.aureus* und KONS findet durch die Schmelzkurvenanalyse statt. Die spezifischen Sonden zeigen hier einen charakteristischen Wert für den *mecA*- Gen Nachweis. Dieser liegt bei $T_m = 64 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abb.5). Werte, die darunter fallen, sind als KONS zu werten. T_m von β -Globin soll bei $56\text{-}60 \text{ }^\circ\text{C}$ liegen.

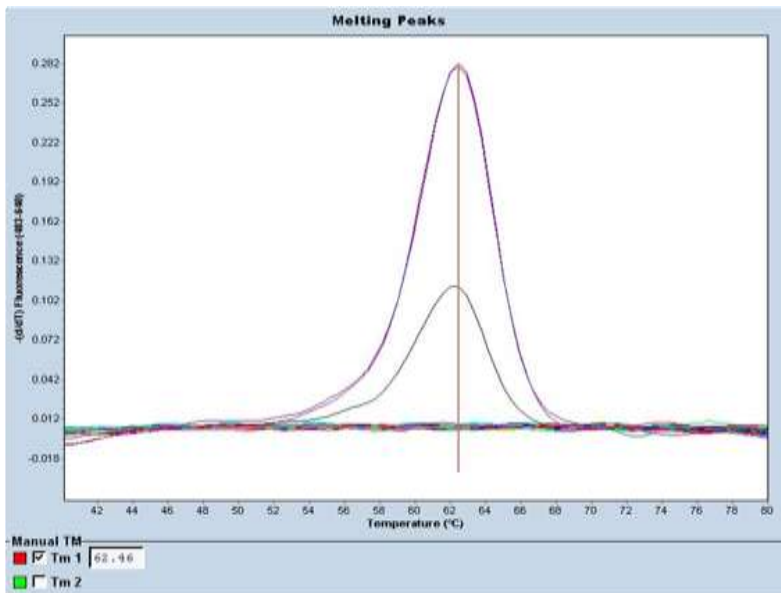


Abb.7 Schmelzkurviendiagramm des mecA-Gen Nachweises mit zwei für S.aureus positiven Proben

3.4.2.6 Analysen von Positiv- und Negativ-Kontrolle

Die Negativ-Kontrolle darf weder während der Amplifikationsanalyse, noch während der Schmelzkurvenanalyse einen Anstieg aufweisen.

Die Positiv-Kontrolle soll in beiden Analysen einen deutlichen Anstieg zeigen

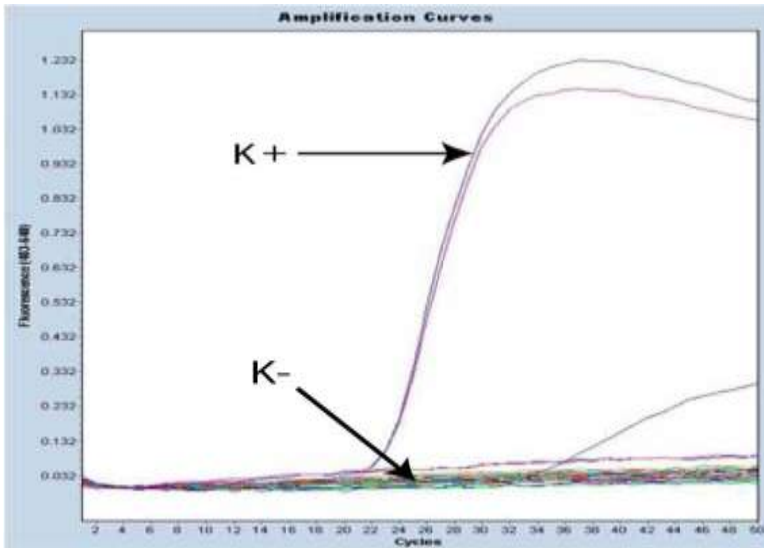


Abb.8 Amplifikationskurve mit unauffälliger Positiv- und Negativkontrolle

3.4.3 Besonderheiten des LightCycler 480

Der LightCycler 480 hat zwei Besonderheiten gegenüber anderen Plattensystemen. Er enthält eine sog. Thermobase, ein unter der Platte liegendes Wärmeelement, welches bewirkt, dass eine einheitliche Erwärmung der Platte stattfindet. Durch dieses System ist er in der Lage, beim Erhitzen eine Temperaturänderung von $4,4^{\circ}\text{C} / \text{s}$ durchzuführen.

Ein Problem der Plattensysteme ist der sogenannte Parallaxenfehler. Dieser entsteht, wenn die gesamte Platte durch allein eine Lichtquelle

bestrahlt wird. Die Proben, die sich dabei in der Mitte der Platte befinden, werden korrekt angestrahlt, weil sie sich im richtigen Winkel zur Lichtquelle befinden. Im Randbereich dagegen wird aufgrund des Winkels nur ein Teil der Lösung angestrahlt und damit auch detektiert. Der LightCycler 480 löst dieses Problem, indem er den Strahlengang mehrfach umlenkt und somit eine große Distanz zwischen Probenplatte und Strahlenquelle simuliert. Dadurch treffen die Strahlen nahezu parallel auf die gesamte Platte, sodass die Reaktion aller Proben korrekt ablaufen und detektiert werden kann.

3.4.4 Befundinterpretation

Die Probe wurde als positiv gewertet wenn die Amplifizierungsanalyse sowie die Schmelzkurvenanalyse ein eindeutig positives Ergebnis ergaben. Zum anderen durfte weder Positiv- noch Negativ-Kontrolle Auffälligkeiten zeigen.

3.5 Statistische Auswertung

Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, wurden aus den Ergebnissen folgende Werte ausgerechnet:

- **Sensitivität:** Sie ergibt sich aus einem Quotienten. Der Zähler wird gebildet aus den „richtig Positiven“. Der Nenner ergibt sich aus der Summe des Wertes des Zählers und den „falsch Negativen“.

Um den Wert prozentual angeben zu können, wird er mit 100 multipliziert(14).
Sensitivität = $100 \times a/(a+c)$

• **Spezifität:** Sie ergibt sich aus einem Quotienten. Der Zähler wird gebildet aus den „richtig Negativen“. Der Nenner ergibt sich aus der Summe des Wertes des Zählers und den „falsch Positiven“.

Um den Wert prozentual angeben zu können, wird er mit 100 multipliziert(14).
Spezifität = $100 \times d/(d+b)$

• **PVW (positiver Vorhersagewert):** Der positive Vorhersagewert ergibt sich aus einem Quotienten. Der Zähler wird gebildet aus den „richtig Positiven. Der Nenner ergibt sich aus der Summe des Wertes des Zählers mit den „falsch Positiven“.

Um den Wert prozentual angeben zu können, wird er mit 100 multipliziert(14).
PVW = $100 \times a/(a+b)$

• **NVW (negativer Vorhersagewert):** Der negative Vorhersagewert ergibt sich aus einem Quotienten. Der Zähler wird gebildet aus den „richtig Negativen. Der Nenner ergibt sich aus der Summe des Wertes des Zählers mit den „falsch Negativen“.

Um den Wert prozentual angeben zu können, wird er mit 100 multipliziert (14).
NPV = $100 \times d/(c+d)$

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse aus dem Kulturnachweisen

Nachdem man die Blut- sowie die Mannit-Platte im Rahmen der Routinediagnostik den in Abschnitt 3.3.3 geschilderten Testreihen unterzogen hatte, wurde die Auswertung zu einem gemeinsamen Ergebnis zusammengefasst. Dabei wurde festgehalten, ob und in welchem Maße sich Wachstum von S.aureus und/oder KONS zeigte und des weiteren, ob es sich bei den gefundenen S.aureus um MRSA handelte. Das Ergebnis wurde als Referenzwert für die anderen durchgeführten PCR-gestützten Nachweisverfahren sowie die CHROMagar™ Platte gewertet.

4.1.1 Ergebnisse der Blutagar- und Mannit-Platte

Insgesamt wurden 174 Proben untersucht. Nach den ersten 24 Stunden wurden sie zum ersten Mal ausgewertet. Wenn sich kein eindeutig positives Ergebnis ergab, wurden die Proben weitere 24 Stunden bebrütet, um sie danach ein zweites Mal abzulesen.

Insgesamt wurde folgende Ergebniskonstellation beobachtet:

Tab.2: Ergebnisse der Referenzkultur

MRSA positiv	MRSA negativ	S.aureus positiv	KONS positiv	Kein Wachstum
36	138	18	92	40

Bei einigen Proben fanden sich Doppelbesiedelungen von koagulase-negativen Staphylokokken, MRSA und/oder S.aureus:

Tab.3: Mischkolonisation

MRSA+KONS positiv	KONS+S.aureus positiv
6	6

4.1.2 Ergebnisse der CHROMagar™MRSA Platten

Der CHROMagar™ ist ein Selektivmedium, das allein zur Identifizierung von MRSA entwickelt wurde. Hierbei soll nach Herstellerangaben die Verstoffwechslung zugesetzter chromogener Stoffe eine malven/rosafarbige Verfärbung der darauf wachsenden

MRSA Kolonien bewirken. Zur MRSA Diagnostik soll allein die Farbbestimmung der Kolonien ausreichen.

Bei 37 Proben wurden die Platten nicht regelrecht abgelesen und bleiben deshalb in diesem Teil der Auswertung unberücksichtigt. Die Proben wurden einmal nach 24 Stunden und ein zweites Mal nach 48 Stunden ausgelesen. Nach 48 Stunden wurde bei verdächtigen Kolonien zusätzlich ein Bestätigungstest mit dem Staphaurex®-Test durchgeführt.

Nach 24 Stunden zeigten sich insgesamt 60 Platten bewachsen, darunter zeigten 32 Platten malven/rosafarbene Kolonien. Auf 77 von 137 Platten konnte kein Wachstum beobachtet werden.

Tab.4: CHROMagar™ MRSA nach 24 Stunden:

	Kein Wachstum	Malven/rosafarbene Kolonien	Nicht rosafarbene Kolonien
negativ	71	3	28
positiv	4	29	0
	75	32	28

Der Vergleich mit den Ergebnissen der Referenzkultur zeigt eine Abweichung bei 12 Proben. Dabei erkannte der CHROMagar 4 Proben als falsch positiv und 8 Proben waren als falsch negativ zu werten.

Tab.5: CHROMagar™ MRSA im Vergleich mit der Referenzkultur nach 24 Stunden:

Referenzkultur	CHROMagar negativ	CHROMagar positiv
negativ	97	4
positiv	8	28

Nach 48 Stunden wurden die MRSA-spezifischen rosafarbenen Kolonien abgelesen und dokumentiert.

Tab.6: CHROMagar™MRSA nach 48 Stunden

CHROMagar negativ	CHROMagar positiv
96	41

Der Vergleich mit der Referenzmethode zeigte deutliche Diskrepanzen. Dabei wichen 14 Proben von den Ergebnissen ab. CHROM™agar erkannte 10 Proben als falsch positiv und 5 Proben als falsch negativ im Vergleich mit der konventionellen Kulturmethode.

Tab.7: CHROMagar™MRSA im Vergleich mit der Referenzkultur nach 48 Stunden

Referenzkultur	CHROMagar negativ	CHROMagar positiv
negativ	91	10
positiv	5	32

Bei Bakterienkolonien von 42 Proben bestand MRSA Verdacht, worauf der Staphaurex®-Test durchgeführt wurde.

Tab.8: Ergebnisse Staphaurex®-Test nach 48 Stunden

	negativ	CHROMagar™ positiv
Staphaurex®-Test positiv	3	31
Staphaurex®-Test negativ	/	8

Damit verbesserte der Staphaurex®-Test erheblich die Bilanz vom CHROMagar™ nach 48 Stunden. Alle 10 auf dem CHROMagar™

"falsch positiven" Proben konnten als MRSA negativ identifiziert werden.

Tab.9: Vergleich CHROMagar™MRSA nach Staphaurex®-Test mit Referenzkultur

Referenzkultur	Nach Staphaurex®-Test CHROMagar negativ	Nach Staphaurex®-Test CHROMagar positiv
negativ	101	0
positiv	2	34

Nach 24 Stunden betrug die Sensitivität für den CHROM™agar 77,8%, die Spezifität 96%. Der positive Vorhersagewert betrug 87,5% und der negative Vorhersagewert 92,3%. Nach 48 Stunden ohne Berücksichtigung des Staphaurex®-Tests ergaben Berechnungen eine Sensitivität von 86,1%, Spezifität von 90,1%, einen negativen Vorhersagewert von 94,8% und einen positiven Vorhersagewert von 75,6%. Bei Berücksichtigung der Ergebnisse des Staphaurex®-Test kam es zu einer deutlichen Verbesserung der Sensitivität auf 100%, der Spezifität mit 100%, des negativen Vorhersagewerts mit 98,1% und des positiven Vorhersagewerts mit 100%.

Bei 7 von den 10 auf CHROMagar™ falsch positiv getesteten Proben konnte eine Besiedelung von KONS oder MSSA festgestellt werden.

Tab.10: Besiedelung der falsch-positiven Proben der CHROMagar™ Platten

	Malven-/rosafarbig nach 24 Stunden	Malven-/rosafarbig nach 48 Stunden
KONS-Wachstum	2	4
MSSA-Wachstum	0	1
KONS+MSSA Wachstum	0	2

4.2 Ergebnisse aus der PCR

Mithilfe der PCR am LightCycler®480 wurden 174 Proben untersucht. Nach Kontrolle der Positiv- wie Negativ-Kontrolle und Analyse der Amplifikationskurven und Schmelzkurven wurden die Ergebnisse anschließend mit der Referenzkultur verglichen.

Dabei ergab die PCR bei 40 Proben ein MRSA positives Ergebnis. Beim Vergleich mit der Kultur zeigten sich bei 11 Proben Abweichungen. Darunter waren 8 Proben, bei denen die PCR positiv und die Kultur negativ ausfielen. Bei 3 Proben ergab die Kultur ein positives und die PCR ein negatives Ergebnis.

Bei einer Probe erschien der β - Globin Gen Nachweis negativ, was auf eine Inhibition der PCR- Reaktion oder einen unzureichend fest

abgenommenen Nasenabstrich hindeutete. Der kulturelle Nachweis und der SCCmec waren dabei auch negativ.

Tab.11: Vergleich der PCR mit der Referenzkultur

	PCR positiv	PCR negativ
Referenzkultur positiv	32	3
Referenzkultur negativ	8	131

Die Sensitivität betrug 91,4%, die Spezifität 94,2%, der negative Vorhersagewert 97,8% und der positive Vorhersagewert 80 %.

Bei allen 8 PCR falsch-positiven Proben konnte in den kulturellen Nachweisverfahren eine Besiedelung von koagulase-negativen Staphylokokken festgestellt werden, bei einer Probe zusätzlich eine Besiedelung von MSSA.

5 Diskussion

Die Resistenzentwicklung von Bakterien gegen Antibiotika stellt eine der großen Herausforderungen der heutigen Medizin dar. Sie ist mit erheblichen Kosten (19,22) und der Gefährdung von Patienten verbunden. Trotz massiver Bemühungen mit der Weiterentwicklung von Antibiotika (32) und Hygienemaßnahmen ist insbesondere die Ausbreitung von MRSA weiter im Ansteigen (31). Ein entscheidender Faktor zur Bekämpfung von MRSA ist die Verbesserung des MRSA-Screenings (7,22). Durch eine zentrale Erfassung von gefährdeten Patienten könnten diese dann gezielt abgestrichen und mittels möglichst sensitiver und schneller Testverfahren untersucht werden. Der Bereich der mikrobiologischen Diagnostik ist geprägt von ständigen Weiterentwicklungen und Innovationen. Insbesondere die PCR-Technologie versucht durch neue Testkonzepte ihre Einsatzmöglichkeiten zu erweitern und zu perfektionieren. Auch der in der Studie verwendete gezielte Nachweis der Integration des SCCmec-Elements in das Genom von *S. aureus* Organismen gehört zu den neuen Konzepten.

Ein anderer Ansatz zur Verbesserung des MRSA-Screenings ist die Weiterentwicklung chromogener MRSA-selektiver Nährböden, die den Nachweis von MRSA mit höherer Sensitivität und Spezifität erlauben sollen.

Beide Konzepte wurden in dieser Studie durchgeführt, bewertet und miteinander verglichen.

5.1 Patientenmaterial

In unserer Studie wurden Proben von Patienten entnommen, die bereits positiv gemeldet waren oder Risikopatienten entsprachen. Die in dem Studienzeitraum als MRSA positiv getesteten Patienten entsprachen nicht der Gesamtzahl an MRSA positiven Patienten des Universitätskrankenhauses, da Patienten mit MRSA wirksamer Therapie und Patienten der Intensivstation nicht einbezogen wurden. Außerdem wurde jeweils nur ein Nasenabstrich durchgeführt, wodurch MRSA-Fälle unentdeckt bleiben konnten, die durch zusätzliche Abstriche von Wunden oder weiteren Körperstellen hätten erkannt werden können (38,5). Da sich diese Studie allein mit der vergleichenden Bewertung der diagnostischen Methoden befasste, konnten hier nicht alle MRSA positiven Patienten erfasst werden.

Von den teilnehmenden Patienten war nicht bekannt, ob sie kurz vorher (unabhängig ihres individuellen MRSA-Status) einer MRSA-wirksamen Antibiotikatherapie unterzogen worden sind. Auch wurde nicht festgehalten, ob der Patient Mupirocin-Salbe in die Nase bekommen hatte. Mupirocin wirkt hauptsächlich bakteriostatisch und kann somit zu einem kulturnegativen Ergebnis und zu einem falsch-positiven PCR-Ergebnis führen.

Die Proben eines Tages wurden gemeinsam ins Labor gebracht. Da die Abstriche nicht zeitgleich, sondern über den Vormittag und manchmal auch in den Nachmittag verteilt durchgeführt wurden, kamen die Proben nicht immer zur selben Zeit ins Labor. Dieser Umstand hat

zwar keinen Einfluss auf die spätere PCR-Analyse, jedoch auf die angesetzte Kultur. Die Kulturen wurden immer am folgenden Tag im Rahmen der Routine gegen ca.12 Uhr das erste Mal abgelesen. Kamen die Proben erst nach 12 Uhr des Abnahmetages ins Labor, konnte es vorkommen, dass die vorgegebenen 24 Stunden als Ablesezeitpunkt unterschritten wurden und damit Kolonien erst zum zweiten Ablesezeitpunkt erkannt werden konnten.

5.2 Kulturergebnisse

Die Ergebnisse nach 24 Stunden des CHROMagars mit Sensitivität 77,8% und Spezifität 96% waren mit den Ergebnissen andere Studien durchaus vergleichbar. Auch wenn Stoakes et al. oder Han et al. in ihren Studien mit Sensitivitäten von 82% und 87,2% und einer Spezifität von 99% und 99,3% etwas bessere Werte erzielten, erhielten wir doch akzeptable Ergebnisse. Um das Ergebnis deutlich zu verbessern, hat sich der zusätzliche Einsatz vom Staphaurex zum S.aureus- Nachweis bewährt. Dadurch konnten Werte von annähernd 100% erreicht werden.

Die Abstrichproben der Studie wurden direkt vom Tupfer auf die Platte aufgetragen. Um die Sensitivität des Tests zu verbessern, könnte man die Probe zuvor für einige Stunden, oder wie in den Studien von Kluytmans et al. und Diederens et al. für 24 Stunden, anreichern. Allerdings würde das Zeit kosten und der Vorteil gegenüber der konventionellen Methode ginge verloren.

Die Auswertung der CHROMagar Platten ergab 10 falsch positive Proben. In 6 konnten koagulase-negative Staphylococci nachgewiesen werden. Das entsprach den Beobachtungen von Walther et al. der in 6 falsch positiven Proben KONS nachwies.

Bei den 5 falsch negativen Ergebnissen könnte eine zu geringe Keimzahl eine Rolle spielen, da der Tupfer nach der Blut und Mannitplatte beimpft wurde und es so zu einer ungleichen Verteilung gekommen sein könnte.

5.3 PCR Ergebnisse

Die SCCmec basierte PCR am LightCycler 480 ergab mit einer Sensitivität von 91,4%, einer Spezifität von 94,2%, negativem Vorhersagewert von 97,8% und positivem Vorhersagewert von 80 % insgesamt ein gutes Ergebnis. Studien mit verschiedenen SCCmec-basierten Testsystemen ergaben Sensitivitäten von 90-100%, Spezifitäten von 93-99%, positive Vorhersagewerte von 80-95% und negative Vorhersagewerte von über 95% (33, 1, 20, 30, 17, 42). Damit liegen die Ergebnisse unserer Studie im Durchschnitt des internationalen Vergleichs. Der hohe negative Vorhersagewert sagt aus, dass die durchgeführte PCR zuverlässig negative Ergebnisse liefert und das zum sicheren Ausschluss von MRSA ausreicht.

Der Vergleich mit der traditionellen Kultur als "Referenzmethode" ergab 8 falsch positive PCR-Ergebnisse. Diese falsch positiven Werte konnten sich durch Folgendes ergeben haben. Die PCR dient allein

zum gezielten Nachweis von DNA-Material. Dabei wird nicht unterschieden, ob die Bakterien lebend, also vermehrungsfähig, oder "tot" waren und nur noch in Form von Zellbestandteilen und DNA vorlagen. Somit kann bei Patienten, die zuvor eine entsprechende Antibiotikatherapie durchlaufen haben, die PCR positiv ausfallen, obgleich die Bakterien durch erfolgreiche Antibiose inaktiviert wurden.

Eine weitere Möglichkeit für falsch positive Ergebnisse stellt in unserem Fall der Gebrauch von Mupirocin-Salbe dar. Auch hier gilt das Prinzip, dass Bakterien dadurch inaktiviert wurden. Bei nachträglicher Betrachtung der mikrobiologischen Befunde dieser Patienten zeigte sich, dass bei 5 von 8 Fällen in früheren Proben MRSA auch kulturell nachgewiesen werden konnte.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich durch KONS, die bei allen 8 Proben nachgewiesen wurden. Man konnte bestimmte KONS isolieren, die einerseits die SCCmec Kasette enthielten, aber auch Nachbarsegmente, die für S.aureus spezifische Integrationsstelle *orfX*. KONS Isolate mit solch homologen Sequenzstrukturen können, wenn auch bisher weltweit nur in sporadischen Einzelfällen beobachtet, bei SCCmec gestützten PCR Nachweissystemen ein falsch positives Ergebnis für MRSA verursachen (33, 27, 8).

Bei 3 der Proben ergab die PCR, im Vergleich mit der traditionellen Kultur als "Referenzmethode", ein falsch negatives Ergebnis. Dies kann sich zum einen durch eine zu geringe Keimzahl erklären lassen (sog. sampling error). In der Theorie wäre ein einzelner DNA-Strang und damit ein MRSA-Erreger ausreichend, um ein positives Ergebnis in der

PCR hervorzurufen. Doch wie des Öfteren kann die Theorie so nicht in die Praxis umgesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Nachweisgrenze bei ca. 30 bis 50 Genomäquivalenten des Erregers pro PCR Nachweisreaktion liegt (12). Da dem Untersuchungsmaterial zur DNA-Isolierung mehrere Lösungen (Lyse Puffer, Lysostaphin, Proteinase K) hinzugefügt wurden, vergrößert sich die Menge auf ca. 260µl. Von jeder Abstrichprobe können jedoch nur 5µl als Ausgangsmaterial in die eigentliche PCR-Reaktion eingesetzt werden. Durch die Verdünnung sind im ursprünglichen Probenmaterial ~2600 Erreger nötig, um eine Reaktion auszulösen.

Ein ähnliches Problem kann sich durch den einen Tupfer ergeben haben, der für beide Reaktionen verwendet wurde. Dabei kann es zu einer unregelmäßigen Verteilung des Untersuchungsmaterials kommen, was zu einer Diskrepanz der Ergebnisse führen kann.

Des Weiteren könnten die falsch negativen Ergebnisse durch eine nicht erkannte Inhibition der Reaktionen aufgetreten sein. Inhibitionen können z.B. durch Medikamentenreste o.ä. am Abstrichort entstehen. Andere Testsysteme beinhalten zusätzlich interne Kontrollen, die ein solches Ereignis aufzeigen. Doch hat sich auch gezeigt, dass durch die Anwesenheit von internen Kontrollen ein gewisser Teil der Effizienz der Amplifikations- und Detektionsreaktion eingebüßt wird. Dies würde dann bei einigen Proben zu dem schon angesprochenen Problem `zu geringer Keimzahl` führen.

Andere Studien konnten belegen, dass das Ergebnis verbessert werden kann, wenn zuvor eine kulturelle Vor-Anreicherung der Erreger

über mehrere Stunden durchgeführt wurde. Dabei kann die Nachweisgrenze auf bis zu 10 Erreger pro Abstrich herabgesetzt werden (12). Allerdings verzögert sich dadurch das Ergebnis meist um einen Tag.

5.4 Vergleich der Kultur mit der PCR

Der Vergleich beider Methoden miteinander ergibt, dass jede seine Vorteile und Nachteile hat. Die konventionelle Kulturmethode wird heutzutage als Goldstandard angesehen. Allerdings benötigt der MRSA-Erregernachweis über konventionelle Kulturverfahren mindestens 24 Stunden, meistens aber zwischen 48-72 Stunden bis das Ergebnis bekannt wird. Dieser Zeitrahmen bedeutet bei vorsorglicher Isolierung des Patienten bis zu 3 Tage Isolierung, was mit psychischer Belastung für den Patienten, Belastung fürs Personal und zusätzlichen Kosten für das Krankenhaus einhergeht. Insbesondere auf Intensivstationen, wo Patienten unter ständiger Überwachung und Pflege stehen, sind die oben genannten Faktoren durch eine unnötige Isolierung verstärkt.

Wird der Patient nicht isoliert, wie es häufig vorkommt, bedeutet diese Zeit die Möglichkeit für den Keim, sich auch auf benachbarte Patienten und Personal auszubreiten und im schlimmsten Fall einen MRSA-Ausbruch auszulösen.

Die neuen chromogenen Medien stellen einen guten Ansatz da, den kulturellen Nachweis zu beschleunigen. Mit der Unterstützung eines zusätzlich durchgeführten Latex-Agglutinationstests können sehr sichere Ergebnisse erzielt werden. Allerdings würde das kaum Zeit

einsparen, da manche Kolonien erst nach 48 Stunden sichtbar wurden. Damit könnte auch erst zu dem Zeitpunkt der eindeutige S.aureus Nachweis durchgeführt und befundet werden.

Die am LightCycler 480 durchgeführte PCR benötigte ca.1.5 Stunden. Die zuvor durchzuführenden DNA-Isolierungsmethoden nahmen abhängig von der Probenanzahl 1.5 bis 2.5 Stunden in Anspruch. Somit lag das Ergebnis des Nukleinsäure-gestützten Direktnachweises von MRSA ca. 3–4 Stunden nach Probeneingang vor. Im Vergleich zur kulturellen Diagnostik ist das eine enorme Zeiteinsparung. Durch ein so schnelles Vorliegen der Ergebnisse treten die zuvor beschriebenen Risiken, durch einen um Tage verzögerten Befund, in diesem Fall nicht auf. Auch ambulante Patienten können nach kurzer Wartezeit mithilfe der PCR- Diagnostik untersucht werden, ohne tagelang auf das Ergebnis warten zu müssen.

Die erzielten Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, negativem Prädiktionswert und positivem Prädiktionswert reichen aus, um eine Infektion bzw. Besiedelung mit MRSA auszuschließen, nicht aber, um diese mit absolut hoher Sicherheit zu bestätigen. Dieser Umstand macht einen zusätzlichen kulturellen Nachweis nötig. Auch ist es problematisch, wenn aufgrund der vermeintlich hohen Sensitivität PCR-Ergebnisse zur Aufhebung von Isolierungsmaßnahmen herangezogen werden, da die Methode auch bei inaktiven Keimen bzw. noch Tage bis Wochen nach erfolgreicher Eradikationsbehandlung zu positiven DNA-Nachweisen führen kann.

Um das Resistenzverhalten der Erreger zu untersuchen, kann die PCR die Kultur allerdings nicht ersetzen. Aber auch bei Einsatz neuerer chromogener Medien kann der Schritt der konventionellen Resistenztestung nicht umgangen werden.

5.5 Kosteneffizienz

Um die kulturellen und die Nukleinsäure-gestützten Nachweisverfahren für MRSA gegeneinander abzuwägen kann der Kostenfaktor nicht ungeachtet bleiben. Bei Betrachtung der Kosten allein für das Material der Tests ergibt sich ein klarer Vorteil der kulturellen Methode gegenüber dem PCR-gestützten Verfahren. Allein Anschaffungskosten von mehreren Zehntausend Euro für die Geräte zur DNA-Isolierung und PCR zeigt einen deutlichen Mehraufwand.

Um die Kosteneffizienz der beiden Nachweismethoden abzuwägen, reicht es nicht aus sich die Kosten für die einzelnen Tests zu betrachten.

Eine Studie von Conterno et al. konnte in einer präzisen Analyse zeigen, dass die Kostendifferenz beider Methoden nur relativ gering ist, wenn man sich die Kosten eines MRSA-Ausbruchs betrachtet, die wie in der Aufstellung nach M.Kanerva et al. im 7-stelligen Euro Bereich lagen. Um solche Ausbrüche zu verhindern, ist ein umfangreiches und schnelles Screening nötig. Bei hoher Inzidenzrate, wie bei einem Ausbruch oder auch auf vielen Intensivstationen, gilt der schnelle PCR-gestützte Nachweis, als kosteneffektiv (22). Für ein generelles Screening bei niedriger Inzidenzrate hat der PCR-gestützte Nachweis aus Kostengründen noch Schwierigkeiten sich durchzusetzen (1). Doch

eine noch so schnelle Diagnostik bringt wenig, wenn die nötigen Hygienemaßnahmen nicht eingehalten werden, um eine Ausbreitung innerhalb der Stationen zu verhindern. Besonders auf den Intensivstationen, welche das größte Einsatzgebiet der PCR-gestützten Schnelltests darstellen, ist die Umsetzung der strikten Hygienemaßnahmen bei gleichbleibender intensiver Pflege oft eine Herausforderung (15).

6. Zusammenfassung

Die besorgniserregende MRSA-Inzidenz in Deutschland erfordert neue Strategien. Insbesondere in Sachen Prävention müssen Veränderungen stattfinden, da sie im Kampf gegen MRSA eine entscheidende Rolle spielt. Das beinhaltet u.a. ein striktes Screening, um bei MRSA-positiven Patienten schnellstmöglich Schutzisolierung sowie Therapiemaßnahmen einzuleiten. Damit soll eine weitere Ausbreitung auf Personal und andere Patienten verhindert werden. Neuentwicklungen auf dem Gebiet der Diagnostik wollen diesen Forderungen nachgehen.

Zum einen sollen neue chromogene Medien den kulturellen Nachweis von 72-48 Stunden auf 24 Stunden verkürzen und durch selektives Wachstum die Identifizierung von MRSA vereinfachen.

Andererseits zeigen Fortschritte in der PCR-Diagnostik, dass gute Ergebnisse auch schon nach 2,5 Stunden vorliegen können.

In unsere Studie wurden beide Verfahren miteinander verglichen. Es wurde ein SCCmec PCR-Nachweis am LightCyler 480 durchgeführt und gleichzeitig CHROMagar™ MRSA Selektivplatten mit dem Probenmaterial beimpft. Als Referenz fand parallel ein konventioneller Kulturnachweis auf Blutagar- und Mannit-Platten statt.

Der CHROMagar™ konnte erst nach Bestätigung der verdächtigen Kolonien durch den Staphaurex® -Agglutinationstest ein zuverlässiges Ergebnis liefern. Allerdings galt das erst nach 48 Stunden Bebrütung. Somit ging der erwartete Zeitvorteil gegenüber der konventionellen

Methode weitgehend verloren. Insgesamt betrachtet stellt der CHROMagar™ MRSA jedoch in mikrobiologischen Laboratorien ohne molekulare Diagnostik eine hilfreiche und einfache Alternative zu konventionellen Nachweisverfahren dar.

Eine enorme Zeiteinsparung konnten wir dagegen mit dem PCR-gestützten Nachweis erzielen. Man erhielt innerhalb von 2,5 – 3,5 Stunden gute und aussagekräftige Ergebnisse, die ausreichten, um MRSA sicher auszuschließen. Nur bei den Kosten pro durchgeführten Test konnte der PCR- Nachweis nicht mit konventionellen Methoden konkurrieren. Bei einem zirka zehnfach höheren Kostenaufwand gegenüber den Kulturverfahren sind die Anwendungsbereiche noch eingeschränkt. Allerdings bleiben bei einem bloßen Vergleich der reinen Material- und Personalkosten diejenigen gesamtökonomischen Einsparungen in einem Krankenhaus, die mit der Schnelligkeit der PCR-gestützten Nachweisverfahren und der damit verbunden schnellen Befundübermittlung verbunden sind, weitgehend unberücksichtigt.

Die Frage nach dem optimalen Nachweisverfahren für MRSA lässt sich abschließend nicht so leicht beantworten. Sowohl PCR-gestützte wie auch neue kulturelle Verfahren finden heutzutage, abhängig von Klinik und Labor, ihre sinnvollen Anwendungs- und Einsatzgebiete. Der PCR-gestützte Nachweis ist zwar deutlich schneller, allerdings schränken bislang die höheren Kosten vielerorts den Einsatz ein. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Entwicklungen innerhalb der modernen MRSA-Diagnostik konsequenterweise in Richtung schnellerer und sichererer Nachweisverfahren führen.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- 1: **Bühlmann M., Bögli-Stuber K., Droz S., Mühlmann K.** Rapid Screening for Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by PCR and Associated Costs. *J Clin Microbiol.* 2007;46(7):2151-2154
- 2: **Conterno L.O., Shymanski J., Ramotar K., Toye B. van Walraven C., Coyle D., Roth R.V.** Real-Time-Polymerase Chain Reaktion of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Impact on Nosocomial Transmission and Costs. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28:1134-1141
- 3: **Choi S.C., Yin S.C., Bakar A.A. Sakewi, Naing N.N., Jamal F, Othman N.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among health adults. *J Microbiol Immunol Infect.* 2006;39:458-464
- 4: **Clancy M., Graepler A., Wilson M., Douglas I., Johnson J. Savor Price C.** Active Screening in high-risk units is an effective and Cost avoidant method to reduce the rate of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in the hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27:1009-1017
- 5: **Currie A., Davis L., Odrobina E., Waldman S., White D., Tomassi J., Katz K.C.** Sensitivities of Nasal and Rectal Swabs for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in an Active Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2008;46:3101-3103

6: **Dancer S.J.** Considering the introduction of universal MRSA screening. The Hospital Infection Society. 2008.

7: **Daschner, Dettenkofer, Frank, Scherrer.** Praktische Krankenhaushygiene und Umweltschutz. Springer-Verlag, 3. Auflage, 2006

8: **Desjardins M., Guibord C., Lalonde B., Toye B., Ramotar K.** Evaluation of the IDI-MRSA Assay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Nasal and Rectal Specimens Pooled in a Selective Broth. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1219-1223

9: **Diederens B., van Duijn I., van Belkum A., Willense P., van Keulen P., Kluytmans J.** Performance of CHROMagar MRSA Medium for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:1925-1927

10: Dissemmond J. Problemkeime sind im Kommen. *Pharmazeutische Zeitung.* 2008:28

11: European Antimicrobial Resistance Surveillance System: www.rivm.nl/earss/result

12: **Hagen R.M., Seegmüller 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

13: **Han Z., Lautenbach E., Fishman N., Nachamkin I.** Evaluation of mannitol salt agar, CHROMagar *Staphylococcus aureus* and CHROMagar MRSA

for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal swab specimens. *J Clin Microbiol.*2007;56:43-46

14 : **Hansen Michael.** Nachweis von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* zum Vergleich von trockenen und feuchten Tupfern und vier chromogenen Selektivmedien.2007.Dissertation

15: **Harbart S., Masuet- Aumatell C., Schrenzel J.,Francois P.,Akakpo C.,Renzi G.,Pugin J.,Ricou B.,Pittet D.**Evaluation of rapid screening an pre-emptive contact isolation for detecting and controlling Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critical care:an interventional cohort study.*Critical Care.*2006;10:R25

16: **Hoc S.** MRSA-Infektionen: Diagnose liegt nach 5 Stunden vor.*Dtsch Arztlbl.*2007;104(23):A-1679

17: **Hope WW,Morton AP,Looke DF,Schooneveldt JM,Nimmo GR.**A PCR method for the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) from screening swabs.2004;36(3):265-8

18: **Kaiser P.** Selektive Kulturmethoden mit chromogenen Medien und PCR-Methoden zum Nachweis von MRSA direkt aus Nasenabstrichtupfern. 2005. Dissertation

19: **Kanerva M.,Blom M.,Tuominen U.,Kolho E.,Anttila V.-J.,Vaara M.,Virolainen-Julkunen A.,Lyytikäinen O.**Costs of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.*J Hosp Infect.*2006; 66:22-28

- 20: **Kerremans Jos J.,Naaskant J., Verbrugh H.A.,van Leeuwen W.B.,Vos C.M.** Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a low-prevalence setting by polymerase chain reaction with a selective enrichment broth.*Diag Microbiol Inf Dis* 2008;61:396-401
- 21: **Kipp F.,Friedrich A. W.,Becker K., von Eiff C.** 2004. Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter-aureus-Stämme:Strategien zur Kontrolle und Prävention in Deutschland.*Dtsch Arztebl* 101(28-29)
- 22: **Kola A.,Chaberny,Mattner F.,Reischl U.,Vonberg R.P.,Weist K.,Wendt C., Witte W.,Zieing S.,Suerbaum S.,Gastmeier P.** Prävention von Methicillin-resistentem *S.aureus* durch Screeninguntersuchungen.*Anaest.*2006;55:778-783
- 23: **Kluytmans Jan, Van Griethuysen Arjanne, Willemsse Piet, Van Keulen Peter.** Performance of CHROMagar Selective Medium and Oxacillin Resistance Screening Agar Base for Identifying *Staphylococcus aureus* and Detecting Methicillin Resistance.*J.Clin.Microbiol.*2002;40:2480-2482
- 24: **Linde Hans-Jörg.** Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter *Staphylococcus-aureus*-Stämme:Community-acquired MRSA.*Dtsch Arztebl.*2005;102(15)
- 25: **Linde H J, Lehn N.** 2005. Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) - Diagnostik. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 130:582-585.

26: **Linde H J, Lehn N.** 2005. Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*(MRSA)-Therapie und Hygiene. Dtsch.Med.Wochenschr.2005; 130:586-588.

27: **Malhotra-Kumar S., Haccuria K.,Michiels M.,Ieven M.,Poyart C., Hrynciwiez W.,Goossens H.**Current Trends in Rapid Diagnostics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Glycopeptide-Resistant Enterococcus Species.J Clin Microbiol.2008;46(5):1577-1787

28:**Meyer E.,Schwab F.,Gastmeier P.,Jonas D.,Rueden H., Dachner F.D.,** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in German Intensive Care Units During 2000-2003:Data from Project SARI.Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27:146-154

29: **Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen:** www.nrz-hygiene.de

30: **Oberdorfer K,Pohl S,Frey M,Heeg K,Wendt C.** Evaluation of a single-locus real time polymerase chain reaction as a screening test for specific detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ICU patients. Eur Clin Microbiol Infect Dis.2006;25(10):657-63

31: **Paul-Ehrlich-Gesellschaft:** www.p-e-g.org

32: **Quintel M, Witte W.** MRSA- eine interdisziplinäre Herausforderung, Pfizer Pharma GmbH, 2005

33: **Reischl U.,Holzmann T.**Aktuelle Verfahren zum Nukleinsäure gestützten Direktnachweis von MRSA.J Lab Med 2008;32(4):253-265

- 34: **Reischl U, Linde H J, Metz M, Leppmeier B, Lehn N.** 2000. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. J.Clin.Microbiol. 38:2429-2433.
- 35: **Roche:** www.roche.com/pcr_d.pdf
- 36: **Robert-Koch-Institut**, Richtlinien für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention, Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus-aureus*-(MRSA)-Stämme in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen
- 37: **Robert Koch-Institut** Epidemiologisches Bulletin 42/2005
- 38: **Robert Koch-Institut** Epidemiologisches Bulletin 42/2005
- 39: **Sächsisches Staatsministerium für Soziales.**2007.caMRSA - der ambulant erworbene MRSA
- 40: **Stoakes L.,Reyes R.,Daniel J.,Lennox G.,John M.A.,Lannigan R.,Hussain Z.**Prospective Comparison of a New Chromogenic Medium,MRSA Select,to CHROMagarMRSA and Mannitol-Salt Medium Supplemented with Oxacillin or Cefoxitin for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J.Clin.Microbiol.2005;44:637-639
- 41: **Walther R.,Lema C.,Flayhart D.,Carroll K.** Comparison of Two Prototypes of BBL™CHROMagar™MRSA to Conventional Media for the Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Clinical Samples.2005

42: **Warren DK,Liao RS,Merz LR,Evaland M,Dunn WM Jr.** Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from nasal swab specimens by real-time PCR assay.JClin Microbiol.2004;42(12):5578-81

43: **Weber JT.**2005.Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis 41:269-272

44: **Wernitz M, Swidsinski S, Weist K,et al.**Effectiveness of a hospital-wide selective screening program for methicillin-resistant Staphylococcus aureus(MRSA) carriers at hospital admission to prevent hospital- acquired MRSA infections. Clin Microbiol Infect 2005;11:457-65

45: **Zimmerli M., Widmer F.A., Dangel 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

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MRSA Prävalenz von 1990-2004

Abbildung 2: Ablauf einer PCR

Abbildung 3: Sensitivität für den MRSA-Nachweis nach

Abstrichort (34)

- Abbildung 4: Übersichtsschema des PCR – Direktnachweises
- Abbildung 5: PCR -Temperaturzyklus im LightCycler 480
- Abbildung 6: Amplifikationskurven mit linear-logarithmischem Anstieg
- Abbildung 7: Schmelzkurviendiagramm des mecA-Gen Nachweises mit zwei S.aureus positiven Proben
- Abbildung 8: Amplifikationskurve mit unauffälliger Positiv- und Negativkontrolle

7.3 Tabellenverzeichnis

- Tab 1: Durch S. aureus und MRSA verursachte Krankheitsbilder
- Tab.2: Ergebnisse der Referenzkultur
- Tab.3: Mischkolonisation
- Tab.4: CHROMagar™ MRSA nach 24 Stunden
- Tab.5: CHROMagar™ MRSA im Vergleich mit der Referenzkultur nach 24 Stunden

- Tab.6: CHROMagar™ MRSA nach 48 Stunden
- Tab.7: CHROMagar™ MRSA im Vergleich mit der Referenzkultur nach 48 Stunden
- Tab.8: Ergebnisse Staphaurex®-Test nach 48 Stunden
- Tab.9: Vergleich CHROMagar™ MRSA nach Staphaurex®-Test mit Referenzkultur
- Tab.10: Besiedelung der falsch-positiven Proben der CHROMagar™ Platten
- Tab.11: Vergleich der PCR mit der Referenzkultur

7.4 Abkürzungsverzeichnis

ATM: Aztreonam

cMRSA: community-acquire Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus

Cp –Wert: Crossing-Point

KONS: koagulase-negative Staphylokokken

MRE: multiresistenten Erreger

MRSA: Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus

MSSA: Methicillin-sensibler Staphylococcus aureus

NCLLS: National Committee of Clinical Laboratory Standard

PB 2a: Penicillin- binding- Protein 2a

PCR: Polymerase-chain-reaction

S.E.T.S.: Swab Extraction Tube System

8 Lebenslauf

Name: Silvia Melanie Grundei

Geboren: 20.08.1982

Geburtsort: Bayreuth

- **20.08.1982** : Geboren in Bayreuth/Deutschland
- **1989 -1993** : Besuch der Grundschule Meyernberg in Bayreuth
- **1993 -2002** : Besuch des Graf -Münster -Gymnasium in Bayreuth
Abschluss : Abitur
- **April 2003** : Beginn des Zahnmedizinstudiums an der Universität Regensburg
- **19.03.04:** Naturwissenschaftliche Vorprüfung
- **28.09.05:** Zahnärztliche Vorprüfung
- **18.06.08** : Staatsexamen der Zahnmedizin
- **24.09.08** : Approbation als Zahnärztin
- **seit 01.03.09:** Vorbereitungsassistentin in der Zahnarztpraxis Dr.Gerd Hase, Stuttgart

VATER: BERNHARD GRUNDEI
GEBOREN: 04.02.1949
BERUF: MEDIZINPHYSIKER

MUTTER: NELIDA GRUNDEI
BERUF: ZAHNÄRZTIN

BRUDER: ALEXANDER NIKOLAS GRUNDEI
Geboren: 14.02.84

9 Danksagung

Ich danke allen, die mir diese Arbeit ermöglicht und mich dabei unterstützt haben.

Besonderen Dank gilt PD Dr. Udo Reischl, der mich durch diese Arbeit begleitet hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Desweiteren möchte ich Anke Behr danken, die mich im Labor tatkräftig unterstützt hat. Durch sie wurde sogar die Laborarbeit am Wochenende zum Vergnügen.

Auch Markus Bollwein möchte ich danken, der mich besonders zum Ende der Arbeit mit seinem Fachwissen unterstützt hat.

Ein kleines Dankeschön auch an meinen Kollegen Michael Hansen, der mich zu Beginn in die Thematik eingeführt und mit der Praxis vertraut gemacht hat.

Abschließend möchte ich meinen Eltern von Herzen danken, die mir den Weg bereiteten und mich immer in allem unterstützt haben.

ZÄ Grundei, Silvia