

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ZUVERLÄSSIGKEIT VON ROUTINEMETHODEN BEI DER ERKENNUNG DER
OXACILLINRESISTENZ BEI MRSA MIT PANTON-VALENTINE-LEUKOZIDIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eva Maria Pirzer

2011

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ZUVERLÄSSIGKEIT VON ROUTINEMETHODEN BEI DER ERKENNUNG DER
OXACILLINRESISTENZ BEI MRSA MIT PANTON-VALENTINE-LEUKOZIDIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eva Maria Pirzer

2011

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	PD Dr. Wulf Schneider
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Salzberger
Tag der mündlichen Prüfung:	10.01.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Staphylococcus aureus - bedeutender Erreger bakterieller Infektionen	3
1.2	Antibiotikatherapie und Resistenzentwicklung bei S. aureus	4
1.2.1	Penicillin und Penicillinresistenz	4
1.2.2	Methicillin und Methicillinresistenz	5
1.2.3	Vancomycin und Vancomycinresistenz	5
1.2.4	Reserveantibiotika und Resistenzen	5
1.3	MRSA - Epidemiologie und Versuch einer Klassifizierung	6
1.3.1	Community Associated-MRSA und Hospital Associated-MRSA	7
1.3.2	Der Pathogenitätsfaktor Panton-Valentine-Leukozidin	8
1.4	Labortechnischer Nachweis von MRSA	9
1.4.1	Verfahren der Oxacillin-Resistenztestung	9
1.4.2	Im Mechanismus der Oxacillinresistenz begründete Problematik der Resistenztestung bei MRSA	10
2	Fragestellung	13
3	Material und Methoden	15
3.1	Allgemeines	15
3.2	Stammsammlung	15
3.2.1	Identifizierung von S. aureus	18
3.2.2	Nachweis des mecA-Gens und des S.aureus-spezifischen Genfragments psa442	19
3.2.3	Nachweis von PBP2a	21
3.2.4	Nachweis des lukS-PV-Gens	22
3.2.5	spa-Typisierung	23
3.2.6	Bestimmung des „multi-locus sequence“-Typs (MLST)	25
3.3	Resistenztestung	26
3.3.1	Agardiffusion	27
3.3.2	Etest®	27
3.3.3	Oxacillin Agar Screen-Test	27

3.3.4	Chromogene Nährmedien	28
3.4	Wachstumseigenschaften	29
3.4.1	NaCl	29
3.4.2	Koloniemorphologie bei 37°C und 42°C	29
3.4.3	Hitzetoleranz	29
3.5	Herstellung der Nährmedien	30
3.5.1	Columbia Schafblutagar (CSB)	30
3.5.2	Müller-Hinton-Agarplatten	30
3.5.3	Mannitol-Kochsalzagar	31
3.5.4	Chromogenen Nährböden	31
3.5.5	Lysogeny Broth (LB)	31
3.6	Statistische Berechnungen	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Resistenztestung bei MRSA mit und ohne PVL	32
4.1.1	Erkennung der Oxacillinresistenz von <i>S. aureus</i> mit positivem <i>mecA</i> -Gen-Nachweis durch verschiedene Methoden der Resistenztestung	32
4.1.2	MHK ₉₀ -Werte (90 %-Perzentile) bzw. Hemmhofdurchmesser von MRSA mit und ohne PVL für verschiedene Antibiotika	35
4.2	Vergleich der Wachstumseigenschaften	37
4.2.1	NaCl-Toleranz	37
4.2.2	Veränderung der Koloniemorphologie bei 42°C im Vergleich zu Wachstum bei 37°C	37
4.2.3	Hitzetoleranz	37
5	Diskussion	38
6	Zusammenfassung	43
7	Literatur	46
8	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	56
9	Danksagung	57
10	Lebenslauf	58

1 Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus* - bedeutender Erreger bakterieller Infektionen

Staphylococcus aureus ist einer der bedeutendsten Erreger sowohl innerhalb als auch außerhalb medizinischer Einrichtungen erworbener bakterieller Infektionen [1].

In den letzten Jahren war *S. aureus* der häufigste Erreger nosokomialer Infektionen in deutschen Krankenhäusern, wie aus Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS; www.nrz-hygiene.de) hervorgeht. Bei *S. aureus* handelt es sich um Gram-positive, nicht sporenbildende, unbewegliche Haufenkokken.

S. aureus ist ein ubiquitär vorhandener Keim, der häufig als Kolonisationskeim Haut und besonders obere Atemwege besiedelt. Die Besiedelung der Nasenhöhlen stellt einen Risikofaktor für eine Infektion mit *S. aureus* dar [2]. Findet der Keim günstige Bedingungen vor, kann es zur Infektion des Wirtsorganismus, Mensch oder auch Tier, kommen.

Eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren erleichtern dabei *S. aureus* das Eindringen und die Vermehrung im Wirtsorganismus und führen zu zahlreichen charakteristischen Krankheitsbildern. Hierbei lassen sich grob drei Typen unterscheiden:

Zum einen treten pyogene Infektionen auf, die von oberflächlichen Läsionen wie Karbunkeln und Furunkeln bis hin zu Wundinfektionen, Abszessen und Empyemen reichen.

Zum anderen findet man systemische Erkrankungen mit hoher Letalität vor, wie Endokarditis, Osteomyelitis, Pneumonie, Hirnabszess, Meningitis, Faszitis und Sepsis. Des Weiteren sind auch Erkrankungen durch Toxine möglich, wie das „Toxic Shock“ Syndrom, das „Scalded Skin“ Syndrom oder Lebensmittelvergiftungen [3], [4].

Seine große Anpassungsfähigkeit ermöglichte *S. aureus* über die letzten 50 Jahre hinweg die Entwicklung zahlreicher Varianten unterschiedlicher Virulenz, welche oft Resistenzen gegen mehrere Antibiotika aufweisen.

Aufgrund dieser Anpassungsfähigkeit und Virulenz stellt *S. aureus* eine klinische Herausforderung dar [5]. Häufig treten Rezidive auf, nicht zuletzt auch wegen der Fähigkeit innerhalb von Wirtszellen geschützt von Angriffen des Immunsystems oder Antibiotika zu überleben [6]. Die Behandlung gestaltet sich aus genannten Gründen anspruchsvoll. Einer korrekten und möglichst raschen Diagnostik, welche eine zügige Einleitung einer adäquaten Therapie ermöglicht, kommt demnach eine große Bedeutung zu.

1.2 Antibiotikatherapie und Resistenzentwicklung bei *S. aureus*

Die meisten *S. aureus*-Stämme weisen heutzutage eine oder mehrere Resistenzen gegen Antibiotika auf. Die große Wandelbarkeit des *S. aureus*, der steigende Selektionsdruck durch vermehrte und oft unkritische Anwendung von Antibiotika, ungenügende Hygienemaßnahmen bzw. Nichteinhaltung von Hygienevorschriften, sowie eine durch Breitbandantibiotika dezimierte Normalflora mögen die Hauptgründe für diese Entwicklung sein. Oft dauert es nur ca. vier Jahre bis nach der Entwicklung einer neuen Substanzklasse die erste resistente *S. aureus* Variante auftritt [7].

1.2.1 Penicillin und Penicillinresistenz

Annähernd 70-80% aller *S. aureus*-Stämme sind durch die Produktion des Enzyms β -Lactamase resistent gegen das klassische, d.h. β -Lactamase sensible, Penicillin.

Penicillin gehört wie auch die Cephalosporine und Carbapeneme zur Gruppe der β -Lactam-Antibiotika, deren bakterizide Wirkung auf den ihnen gemeinsamen β -Lactam Ring zurückzuführen ist. Diese Struktur ermöglicht die Bindung und damit Inaktivierung eines bakteriellen Enzyms, des Penicillin-Binde-Proteins (PBP), welches für die bakterielle Zellwandsynthese bei gram-positiven und gram-negativen Keimen benötigt wird.

Die β -Lactamase hydrolysiert die β -Lactame am β -Lactam-Ring, wodurch die Bindung an PBP verhindert wird [8].

1.2.2 Methicillin und Methicillinresistenz

Um Infektionen mit Penicillin-resistenten, β -Lactamase produzierenden Keimen therapieren zu können, entwickelte man β -Lactamase-stabile β -Lactame, deren β -Lactam-Ring sterisch abgeschirmt und somit schlechter durch β -Lactamase angreifbar ist.

Erster Vertreter dieser Substanzklasse war das im Jahre 1959 eingeführte Methicillin, welches heute nicht mehr eingesetzt wird. Es folgten Oxacillin, Dicloxacillin und Flucloxacillin.

Schon 1961 fand sich in England der erste Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) [9]. Die Methicillinresistenz wird verursacht durch ein alternatives Penicillin-Binde-Protein (PBP2a), kodiert durch das so genannte *mecA* Gen. Es besitzt eine niedrigere Affinität zum β -Lactam-Ring, was eine Resistenz gegen alle β -Lactame zur Folge hat [10]. Oft finden sich in diesem Fall auch Resistenzen gegen andere Antibiotikasubstanzklassen, wie Chinolone, Tetracycline, Aminoglykoside, Sulfonamide oder Makrolide. Man spricht hierbei von Multiresistenz.

1.2.3 Vancomycin und Vancomycinresistenz

Bei der Therapie von MRSA vermittelten Infektionen sind Glycopeptide wie Vancomycin das Mittel der Wahl. Glycopeptide hemmen die Bakterienzellwandsynthese, wirken also bakterizid, indem sie an Zellwandbausteine binden bevor eine Quervernetzung stattfinden kann, was Perforationen und letztlich den Tod der Bakterienzelle zur Folge hat.

1996 fand man in Japan Isolate mit verminderter Vancomycinempfindlichkeit (VISA) [11]. Unter anderem aus Frankreich und den USA sind Fälle Vancomycin-resistenter *S. aureus* (VRSA) bekannt [12], [13], [14], [15].

1.2.4 Reserveantibiotika und Resistenzen

Liegt eine Infektion mit VISA oder VRSA vor, stehen sogenannte Reserveantibiotika wie Linezolid, Daptomycin, Tigecyclin und Quinupristin/Dalfopristin zur Verfügung. Die genannten Antibiotika hemmen die Proteinbiosynthese am Bakterienribosom.

Für Linezolid hat das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte als Reaktion auf eine Studie, welche eine unter bestimmten Umständen erhöhte Letalität im Zusammenhang mit der Anwendung von Linezolid nachweist, eine Zulassungsbeschränkung erlassen. Demnach darf Linezolid bei Nachweis von oder Verdacht auf eine Mischinfektion durch Gram-positive und Gram-negative Erreger nur beim Fehlen von Behandlungsalternativen und bei gleichzeitiger spezifischer Therapie der Gram-negativen Erreger angewendet werden [16]. Als Mittel der Wahl gelten daher Tigecyclin, Daptomycin und Quinupristin/Dalfopristin, wobei letzteres Präparat nicht im deutschen Handel erhältlich ist. Jedoch treten auch gegen Quinupristin/Dalfopristin schon Resistenzen auf [17].

1.3 MRSA - Epidemiologie und Versuch einer Klassifizierung

MRSA ist als nosokomialer Problemkeim seit 1961 bekannt und ist weltweit verbreitet. So machen MRSA in den USA circa 60% der Krankenhausisolaten von *S. aureus* aus [1]. Im Vereinigten Königreich liegt dieser Anteil bei 40% [18]. Mit circa 3% vergleichsweise niedrig ist der Anteil in Skandinavien und den Niederlanden, wo rigorose Maßnahmen zur Infektionskontrolle praktiziert werden [19].

Auch in Deutschland sind MRSA in den letzten 10 Jahren zu einem klinischen Problem geworden [20]: Nach einer Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft 2004 haben MRSA in der BRD unter Krankenhausisolaten von *S. aureus* einen Anteil von 22,4% (www.p-e-g.de) Bei bis zu 30% aller nosokomial erworbenen Infektionen handelt es sich um MRSA. Die Prävalenz von MRSA bei Klinikpatienten und Bewohnern von Altenheimen liegt zwischen 1 bis 4% [21]. Jährlich treten circa 50.000 Neuinfektionen auf, 700-1500 Todesfälle werden auf MRSA zurückgeführt [22].

1.3.1 *Community Associated-MRSA und Hospital Associated-MRSA*

Seit den 90ziger Jahren werden weltweit neue Varianten von MRSA beobachtet, die bei Patienten ohne Risikofaktoren außerhalb medizinischer Einrichtungen gefunden werden [23].

Typisch ist das Auftreten bei Personengruppen mit engem körperlichen Kontakt, wie Familienmitgliedern, Sexualpartnern, Sportlern mit Kontaktsportarten, Schiffsbesatzungen oder Gefängnisinsassen [24], [25], [26].

Oft sind diese speziellen MRSA-Stämme nur gegen wenige Antibiotikastanzklassen resistent, sind jedoch im Gegensatz zu klassischen MRSA nicht selten resistent gegen Fusidinsäure [27]. Häufig sind sie mit speziellen Pathogenitätsfaktoren ausgestattet, wie dem Panton-Valentine Leukozidin (PVL), Staphylokokken Enterotoxin H, Bakteriozin, sowie mehr als 25 weiteren Toxinen [28].

Auch im östlichen Bayern tritt seit 1995 ein solcher MRSA-Stamm mit PVL endemisch in und außerhalb von Krankenhäusern auf (MLST-Typ 22, *spa*-Typ t310¹; lf. Nr. 14 in der vorliegenden Arbeit) [29].

Diese Isolate werden nach einer epidemiologischen Definition der CDC (Centers for Disease Control and Prevention) als „community-associated“ MRSA (CA-MRSA) bezeichnet (www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.html) [30], [31].

Dagegen werden so genannte „hospital-associated“ MRSA (HA-MRSA) abgegrenzt, die bei Patienten mit klassischen Risikofaktoren (z. B. Krankenhausaufenthalt, Antibiotikatherapie, Wunde) aus medizinischen Einrichtungen gefunden werden.

Neben dem Krankenhaus und der „community“ wurde bei Tieren (Haustiere, Pferde, Schweine) ein drittes Reservoir von MRSA entdeckt [32], [33], [34]. Laut Khanna finden sich Hinweise auf eine Übertragung zwischen Mensch und Tier [35].

¹ MLST: „multi locus sequence typing“, DNA-Sequenz basierte Typisierungsmethode; *spa*: Gen, welches das *S.aureus*-spezifische Protein A kodiert, und auch der Typisierung dient.

Verschiedene genetische Marker wurden zur Charakterisierung von MRSA-Stämmen vorgeschlagen (*spa*-Typ, *SCCmec*-Typ¹, Status für PVL).

Dabei hat sich allerdings gezeigt, dass keiner dieser Marker zur zuverlässigen Abgrenzung von CA-MRSA und HA-MRSA geeignet ist.

Für den Großteil der CA-MRSA-Stämme gilt dennoch, dass sie eine *SCCmec*-Kassette vom Typ IV oder V aufweisen [36] und die Genkassette für PVL tragen. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit der PVL-Status zur Abgrenzung von CA-MRSA und HA-MRSA benutzt [37].

1.3.2 Der Pathogenitätsfaktor Panton-Valentine-Leukozidin

S.aureus Isolate mit PVL wurden erstmals 1932 in London von Panton und Valentine bei Patienten mit rezidivierenden Abszessen beschrieben [38]. Der putative Pathogenitätsfaktor PVL ist klinisch mit dem Auftreten von Furunkeln und Abszessen assoziiert, die häufig multipel, rezidivierend, und mit Häufungen unter Personen mit engem Kontakt auftreten [39], [40]. Oft besteht kein Hinweis auf eine Eintrittspforte, so ist im Anfangsstadium die Verwechslung mit Insektenstichen möglich [4]. Selten ergeben sich schwere Komplikationen wie Osteomyelitis, Endokarditis, septische Arthritis, nekrotisierende Fasziiitis, nekrotisierende Pneumonien sowie Orbitaphlegmone [41].

In Tiermodellen zur Rolle von PVL in der Pathogenese ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse, die für und gegen eine besondere Rolle von PVL sprechen. In einer aktuellen Arbeit konnte mit isogenetischen Stämmen (mit und ohne PVL) in einem Pneumoniemodell in der Maus PVL als kausaler Faktor für die Entstehung von nekrotischen Lungenveränderungen demonstriert werden [42].

¹ *SCCmec*: „staphylococcus cassette chromosome“ (siehe 1.4.2)

PVL ist ein 2-Komponenten-Toxin, kodiert durch die Gene *lukF-PV* und *lukS-PV* [43]. Diese Gene befinden sich auf Phagen von *S.aureus*, was die Verbreitung des Toxins in verschiedene (auch methicillin-sensible) *S.aureus*-Stämme ermöglicht [44].

Der Nachweis von PVL erfolgt bei typischem Krankheitsbild oder auffälligem Resistenzphänotyp durch Nachweis der *lukF/S-PVL*-Gene mittels Polymerasekettenreaktion [39].

PVL verursacht durch Porenbildung die Lyse von polymorphkernigen Granulozyten und Makrophagen [45]. Chemotaktische Faktoren führen zu Vasodilatation und Einstrom von Leukozyten [46] aber auch zu Hemmung der H_2O_2 Produktion [47] und letztendlich zum Zelltod [48]. Die oft beobachtete Gewebnekrose scheint Folge des massiven Leukozytenzerfalls zu sein. Obwohl die Patienten hohe Antikörpertiter gegen PVL besitzen [49], ist der Körper oft nicht im Stande, das Rezidivieren von Abszessen zu verhindern [4]. Die aufgrund von PVL mangelnde Unterstützung durch Leukozyten mag hierbei eine Rolle spielen.

1.4 Labortechnischer Nachweis von MRSA

1.4.1 Verfahren der Oxacillin-Resistenztestung¹

Für die Diagnostik von MRSA stehen eine Reihe etablierter Verfahren zur Verfügung [50]. Generell sind auf der Resistenztestung beruhende Verfahren kostengünstiger und erfordern weniger technischen Aufwand, wohingegen auf dem Direktnachweis des *mecA*-Gens bzw. dem Nachweis dessen Genprodukts PBP2a beruhende Verfahren schneller und zuverlässiger sind.

¹ Methicillin ist heute nicht mehr im Gebrauch, steht also zur Resistenztestung nicht zur Verfügung. An seiner Stelle wird oft Oxacillin verwendet. Daher wird in dieser Arbeit im Zusammenhang mit Resistenztestung der Begriff Oxacillinresistenz verwendet.

Da bei Verfahren zur Resistenztestung im Mechanismus der Oxacillinresistenz begründete Probleme eine korrekte Diagnose erschweren können (siehe nächster Unterpunkt), gelten der *mecA*-Genachweis mittels Nukleinsäureamplifikationstechniken und der PBP2a-Nachweis durch monoklonale Antikörper als „Goldstandard“ der Detektion der Oxacillinresistenz.

Diese Nachweismethoden liefern zuverlässige Ergebnisse nach 1–5 Stunden [51], stehen aber nicht in jedem Fall zur Verfügung.

Als auf der Testung der Oxacillinresistenz beruhende Verfahren werden neben der MHK¹-Bestimmung (mittels Makro- oder Mikrobouillon, Etest®, automatisierte Methoden) hauptsächlich Screeningmethoden (Agardilutionstest mit Oxacillin 6 mg/l auf Mueller-Hinton oder Agardiffusionstest mit Cefoxitin 30 µg nach CLSI bzw. entsprechende Verfahren nach DIN²) eingesetzt. Genannte Verfahren setzen eine vorhergehende Isolierung und Identifizierung von *S.aureus* voraus, was die Gesamtbearbeitungsdauer erhöht. Seit kurzem sind für Screeningzwecke von verschiedenen Herstellern auch chromogene Medien verfügbar, die spezifische Wachstumsbedingungen für MRSA mit einer Farbreaktion koppeln. Hierbei entfällt der Arbeitsschritt der vorhergehenden Isolierung und Identifizierung.

1.4.2 Im Mechanismus der Oxacillinresistenz begründete Problematik der Resistenztestung bei MRSA

Definitionsgemäß liegt eine Resistenz vor, wenn die MHK, also die Konzentration eines Antibiotikums, die das Bakterienwachstum gerade noch hemmt, erhöht ist.

Eine MHK-Erhöhung für Oxacillin kann bei *S. aureus* durch verschiedene Mechanismen bedingt sein:

1. verminderte Affinität zu β -Lactamen durch das alternative Penicillin-Bindeprotein PBP2a,
2. Überproduktion von β -Lactamase (selten Resistenz gegen Methicillin durch spezifische Methicillinase),

¹ MHK: Minimale Hemmkonzentration (siehe 1.4.2)

² CLSI: “Clinical and Laboratory Standards Institute”; DIN: Deutsche Industrie Norm

3. Modifikation von PBPs [52].

Bei klinischen MRSA-Isolaten wird als Resistenzmechanismus am häufigsten PBP2a gefunden. Die Expression von PBP2a führt in Abhängigkeit weiterer Faktoren (u. a. *fem*, *aux*, *ilm*, *fmt*, *sigB*) zu einer Erhöhung der MHK von Oxacillin von 1 bis > 256 mg/l.

PBP2a wird vom *mecA*-Gen kodiert, das auf so genannten SCC*mec*-Elementen gefunden wird [53], [54]. SCC*mec*-Elemente (es wird eine zunehmende Anzahl beschrieben [36]) werden von *S. aureus* durch einen bislang nicht bekannten Mechanismus lateral erworben und sind ca. 20–60 Mb groß. Sie können Regulationselemente für das *mecA*-Gen, weitere Resistenzfaktoren sowie offene Leserahmen mit unbekannter Funktion enthalten [55].

Eine besondere Schwierigkeit bei der Testung der Oxacillinresistenz ist die Tatsache, dass bei vielen Stämmen das *mecA*-Gen in vitro zunächst nur bei einer von 10.000 bis 100.000 Zellen aktiv ist („Heteroresistenz“). Ohne Anwesenheit von Induktoren (z.B. β -Lactamen) verhindert ein Repressor die Transkription des *mecA*-Gens und somit die Produktion von PBP2a. Erst bei Kontakt zum Antibiotikum löst sich – vermittelt über eine Signalkette – der Repressor vom DNA-Strang, PBP2a wird vermehrt gebildet, die Ausprägung der Resistenz wird „induziert“ [56].

Diese Induktionswirkung ist bei den verschiedenen β -Lactamen unterschiedlich ausgeprägt, so hat beispielsweise Cefoxitin eine stärkere, Oxacillin eine schwächere induktive Wirkung. Für eine sichere Erkennung der Oxacillinresistenz muss jedes Test- bzw. Screening-Verfahren zu einer zuverlässigen Induktion des *mecA*-Gens führen. Als besonders zuverlässiger Induktor wird derzeit Cefoxitin eingestuft [57] [58] [59].

Aus zwei Gründen ist die Erkennung von MRSA mit PVL besonders schwierig: Zum einen liegt die Oxacillin-MHK von MRSA mit PVL (~ CA-MRSA) mit 1–16 mg/l häufig nahe bzw. sogar unter den Konzentrationen, die zur Induktion des *mecA*-Gens bei MRSA ohne PVL empfohlen werden [36].

Dies könnte auf Screeningplatten mit einer Oxacillinkonzentration von 6 mg/l zu verzögertem oder ausbleibendem Wachstum führen. Zum anderen sind MRSA mit PVL gegen andere Antibiotikastanzklassen meist noch sensibel, so dass der multiresistente Phänotyp als Hinweis auf das gleichzeitige Vorliegen einer Oxacillinresistenz bei CA-MRSA oft entfällt.

Fragestellung

Mit dem Aufkommen neuer MRSA-Varianten mit PVL stellt sich die Frage, ob diese verlässlich mit Routinemethoden zur Resistenztestung bzw. MRSA-Screening erkannt werden können. Inwieweit sind also Methoden zur Bestimmung der Oxacillinresistenz bei MRSA mit PVL geeignet? Wie zuverlässig werden CA-MRSA von chromogenen Nährböden (zur schnellen Erkennung von (HA-)MRSA) erkannt?

Welche Wachstumseigenschaften zeigen MRSA mit PVL unter verschiedenen Kulturbedingungen? Welche besonderen Eigenschaften (z. B. NaCl-Toleranz, Induzierbarkeit des *mecA*-Gens, Heteroresistenz für Oxacillin, Hitzetoleranz etc.) könnten möglicherweise bei der Optimierung bestehender oder Entwicklung spezieller Testverfahren ausgenutzt werden?

Ausgehend von dieser Fragestellung befasst sich die vorliegende experimentelle Arbeit daher mit der Untersuchung des Wachstumsverhaltens verschiedener Stämme von *S. aureus* unter verschiedenen Testbedingungen.

Zielsetzung der Arbeit ist die Testung der Zuverlässigkeit verschiedener Routinemethoden zur Erkennung der Oxacillinresistenz bei MRSA-Stämmen mit PVL.

Hierbei bediente man sich einer Auswahl von 37 *S. aureus*-Stämmen mit unterschiedlichem *spa*-Typ (MRSA mit PVL: $n = 25$; MRSA ohne PVL: $n = 9$; Methicillin-sensible *S. aureus* (MSSA): $n = 3$). Folgende Verfahren zur Testung der Oxacillinresistenz wurden untersucht:

Oxacillin Agar Screen nach CLSI, Bestimmung der MHK für Oxacillin und Cefoxitin mittels Etest®, Agardiffusion mit Cefoxitin, sowie die chromogenen Nährmedien „CHROMagar® MRSA“, „chromID MRSA®“, „MRSASelect®“ und „Chromogener MRSA-Selektivnährboden“.

Um nach eventuellen Unterschieden zwischen MRSA mit und ohne PVL bezüglich der Empfindlichkeit für weitere Antibiotika zu suchen, erfolgte außerdem die Bestimmung der MHK für Vancomycin, Fusidinsäure, Clindamycin, Linezolid, Doxycyclin, Moxifloxacin,

Tigecyclin, Rifampicin, Co-Trimoxazol (SXT) und Mupirocin mittels Etest®, sowie mittels Agardiffusion für Gentamicin und Kanamycin.

Zusätzlich wurden die NaCl-Toleranz, die Hitzetoleranz, sowie phänotypisch zu beobachtende Wachstumsveränderungen bei 42°C im Vergleich zu 37°C bestimmt, um ein eventuell unterschiedliches Wachstumsverhalten von MRSA mit bzw. ohne PVL unter verschiedenen Kulturbedingungen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Um Kontamination mit ubiquitär vorhandenen Bakterien und Pilzen vorzubeugen, kam bei Arbeiten, wie dem Anmischen von Nährmedien, der Herstellung der Agarplatten, der Inokulation von Nährmedien, dem Abimpfen von Reinkulturen und anderen kontaminationssensiblen Arbeitsschritten eine Steril-Arbeitsbank mit Laminar-Air-Flow-System zum Einsatz. Des Weiteren wurden stets Latexhandschuhe getragen.

Die Verwendung der Steril-Arbeitsbank dient, genauso wie das tragen von Handschuhen, außerdem der Verminderung des Infektionsrisikos. Nach Beendigung der Arbeit mit infektiösem Material und bei Verlassen des Raumes wurde eine hygienische Händedesinfektion durchgeführt

Der Abwurf der verwendeten kontaminierten Materialien erfolgte im Kunststoffbeutel direkt an der Werkbank während des Arbeitens. Anschließend wurde der Beutel in einem Müllbehälter entsorgt und autoklaviert. Wieder verwendbares Instrumentarium wurde sterilisiert, oder - wenn dies aus materialtechnischen Gründen nicht möglich war - mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Ebenso wurden die Arbeitsflächen nach jedem Arbeitsschritt desinfiziert.

2.2 Stammsammlung

Für die vorliegende Arbeit wurden 37 *S. aureus*-Stämme aus der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg sowie aus einer Sammlung internationaler Stämme [60] ausgewählt. Sie stammen von humanmedizinischen Proben.

Die Identifizierung und Typisierung dieser Stämme wurde für diese Arbeit vom Doktoranden nicht selbst durchgeführt, sondern erfolgte schon bei der Erstellung der Sammlung im Institut mittels unter 3.2.1. bis 3.2.6. beschriebener Methoden.

Bei der Auswahl der MRSA-Stämme mit PVL wurde auf epidemiologische und genotypische Informationen zurückgegriffen und die Stämme so ausgewählt, dass sie möglichst viele verschiedene Herkunftsorte bzw. *spa*-Typen repräsentierten. Die 37 Stämme lassen sich in vier Kategorien einteilen: Kategorie 1: MSSA ohne PVL ($n = 2$), Kategorie 2: MSSA mit PVL ($n = 1$), Kategorie 3: MRSA ohne PVL ($n = 9$), Kategorie 4: MRSA mit PVL ($n = 25$). Als Referenzstämme für die Qualitätskontrolle fungierten die Isolate ATCC 25923 (Kategorie 1) und ATCC 43300 (Kategorie 3). Bei der Testung von Tigecyclin wurde zur Qualitätskontrolle der Stamm ATCC 29213 eingesetzt.

Eine Übersicht über die Herkunft, den *mecA*- bzw. *lukS*-PV-Status sowie den *spa*- und MLST-Typ findet sich in **Tabelle 1**.

Tab. 1. *mecA*- und *lukS*-PV-Gen-Status, *spa*- und MLST-Typ sowie Herkunft und Eigennamen der *S. aureus*-Stämme.

Nr.	<i>mecA</i> -Gen	<i>lukS</i> -PV-Gen	<i>spa</i> -Typ	MLST	Herkunft	Eigennamen
5	+	+	t019	30	Indonesien	South-West Pacific clone
7	+	+	t310	22	Oberpfalz	Oberpfälzer PVL-MRSA
13	+	+	t044	80	Europa	Europäischer PVL-MRSA
14	+	+	t310	22	Oberpfalz	Oberpfälzer PVL-MRSA
15	+	+	t310	22	Oberpfalz	Oberpfälzer PVL-MRSA
16	+	+	t044	80	Saudi-Arabien	
17	+	+	t044	80	Saudi-Arabien	
18	+	—	t110	n. d.	Oberpfalz	
19	+	—	n. d.	n. d.	Oberpfalz	
20	+	—	t003	n. d.	Oberpfalz	

Nr.	<i>mecA</i> -Gen	<i>lukS</i> -PV-Gen	<i>spa</i> -Typ	MLST	Herkunft	Eigennamen
21	+	+	t355, t1123	152	Kosovo	
22	+	+	neu, ähnlich t355	152	-	
24	+	+	t309	22b	-	
25	+	+	t1105	617	-	
26	+	—	t001	228	Oberpfalz	
27	+	+	t355	152	Serbien	
28	+	+	t355	377	USA	
29	+	+	t310	22	Oberpfalz	Oberpfälzer PVL-MRSA
30	+	+	t310	22	Oberpfalz	Oberpfälzer PVL-MRSA
32	+	+	t008	8	USA	USA300
34	+	+	t437	n. d.	Oberpfalz	
35	—	+	t438	n. d.	Kontrolle	ATCC 49775
37	+	—	t432	22	Dresden	
38	+	—	t005	22	Dresden	
43	+	+	t044	80	Schweiz	
44	+	+	t019	30	Schweiz	
47	+	+	t044	80	England	
48	+	—	t032	22	Dresden	
49	+	+	t044	583	Australien	
50	+	+	t008	8	Australien	
51	+	+	t211	8	Australien	
52	+	+	t202	93	Australien	
53	+	+	t127	1	Australien	
56	—	—	t021	30	Kontrolle	ATCC 25923
57	+	—	t007	39	Kontrolle	ATCC 43300
58	—	—	t607	1	Kontrolle	Sanger 476
59	+	—	t018	36	Kontrolle	Sanger 252

n. d.: nicht durchgeführt

Die Stämme wurden im Gefrierschrank bei -20°C auf Kunststoffkügelchen in Cryobank-Röhrchen (Mast Diagnostica, Reinfeld) gelagert.

Für alle Versuche wurden frische Übernachtkulturen angezüchtet. Hierfür wurden pro Stamm 2-3 Kügelchen entnommen und ein 3-Ösenausstrich auf Columbia Schafblutagar (CSB) angefertigt, welcher übernacht bei 37°C bebrütet wurde.

2.2.1 Identifizierung von *S. aureus*

Die Identifizierung von *S. aureus* erfolgte über ein positives PCR¹-Ergebnis für das *S. aureus*-spezifische Genfragment *psa442* [51] (siehe Kapitel 3.2.2), sowie über spezifische Antikörper (SLIDEX® Staph-Kit, bioMérieux, Nürtingen).

Der SLIDEX® Staph-Kit weist eine Spezifität von 98.8% auf. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Kurz gefasst: Die Latex-Reagenzien wurden gut aufgeschüttelt. In der Tropfpipette des Kits befindliche Tropfen wurden gut mit dem Fläschcheninhalt gemischt. Auf zwei Felder eines sauberen Objektträgers wurden je ein Tropfen R1 (anti-*S. aureus* Reagenz) und ein Tropfen R2 (Negativkontrolle) gegeben. In jeden Tropfen wurden mit einer Kunststoff-Öse ein bis zwei mittelgroße Kolonien gegeben und 10 Sekunden lang sorgfältig und vollständig in dem Tropfen verrieben. Der Objektträger wurde dann etwa 20 Sekunden lang leicht rotierend bewegt und die Reaktion bei normalen Lichtverhältnissen ohne Lupe abgelesen.

Als positive Reaktion wurde gewertet, wenn in R1 innerhalb von 30 Sekunden (Dauer des Mischens + Rotation des Objektträgers) eine Agglutination der sensibilisierten Erythrozyten (rote Färbung), der Latexpartikel (weiße Färbung) oder beider Reagenzien (rot/orange Färbung) sichtbar wurde.

Die Agglutination der sensibilisierten Erythrozyten weist die Anwesenheit von Clumpingfaktor nach. Die Agglutination der Latexpartikel weist Protein A oder spezifische

¹ PCR: "polymerase chain reaction", Polymerasekettenreaktion

Oberflächenantigene, gegen die der monoklonale Antikörper auf den Latexpartikeln gerichtet ist, nach.

2.2.2 Nachweis des *mecA*-Gens und des *S. aureus*-spezifischen Genfragments *psa442*

Der Nachweis des *mecA*-Gens und des *S. aureus*-spezifischen Genfragments *psa442* erfolgte mittels real-time PCR im Duplexverfahren nach Reischl [51], [61]:

Zum Einsatz kam hierbei das LightCycler®-Gerät von Roche (Roche Diagnostics, Mannheim), welches ultraschnelle Temperaturzyklen und die online Beobachtung der Menge an gebildetem spezifischem PCR-Produkt im Amplifizierungsmix ermöglicht.

Die für die PCR benötigte chromosomale DNA der jeweiligen Stämme wurde mit Hilfe eines einfachen, schnellen Erhitzungsprozesses extrahiert [62]: Kurz gefaßt, eine Bakteriensuspension aus einzelnen Kolonien in 200 µl Lyse-Puffer (1% Triton X-100, 0.5% Tween 20, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) wurde 10 min in einem Reagenzgefäß mit Schraubverschluß in einem kochenden Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei $10.000 \times g$ 2 min zentrifugiert, um den Debris abzusetzen. Vom klaren Überstand wurde ein 2 µl Aliquot direkt in den PCR Apparat transferiert.

Die für die Amplifizierung und den Sequenz-spezifischen Nachweis des 408-bp langen *mecA*-Genfragments und des 179-bp langen *S. aureus*-spezifischen Genfragments *psa442* benötigten Oligonukleotid-Primer und fluoreszierenden LightCycler®-Hybridisierungssonden wurden von TIB Molbiol (Berlin) bezogen.

Für das Zielgen *mecA* handelte es sich hierbei um folgende Oligonukleotide:

Das Primerpaar Mec-F (Sequenz: CAAGATATGAAGTGGTAAATGGT; Nukleotidposition: 1471–1493; Genbankzugangsnummer: X52593) und Mec-R (Sequenz: TTTACGACTTGTTGCATACCATC; Nukleotidposition: 1879–1857; Genbankzugangsnummer: X52593), sowie das Sondenpaar Mec-HP-1 (Sequenz: CAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATT-[FAM]; Nukleotidposition: 1690–1718;

Genbankzugangsnummer: X52593) und Mec-HP-2 (Sequenz: [Red 640]-ACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCG-Ph; Nukleotidposition: 1720–1739; Genbankzugangsnummer: X52593).

Für das Zielgen *Sa442* handelte es sich um folgende Oligonukleotide:

Das Primerpaar Sa442-F (Sequenz: GTCGGGTACACGATATTCTTCACG; Nukleotidposition: 12–34; Genbankzugangsnummer: AF033191) und Sa442-R (Sequenz: CTCTCGTATGACCAGCTTCGGTAC; Nukleotidposition: 191–168; Genbankzugangsnummer: AF033191), sowie das Sondenpaar Sa442-HP-1 (Sequenz: TACTGAAATCTCATTACGTTGCATCGGAA-[FAM]; Nukleotidposition: 95–123; Genbankzugangsnummer: AF033191) und Sa442-HP-2 (Sequenz: [Red 705]-ATTGTGTTCTGTATGTAAAAGCCGTCTTG-Ph; Nukleotidposition: 126–154; Genbankzugangsnummer: AF033191).¹

Der Amplifizierungsmix enthielt 2 µl 10× LightCycler® FastStart DNA Master Hybridisierungssonden-Mix (Roche Diagnostics, Mannheim), 5 mM MgCl₂ (Gesamtkonzentration), je 1 µM Mec-F und Mec-R Primer-Oligonukleotid, je 0.25 µM Sa442-F und Sa442-R Primer-Oligonukleotid, je 0.2 µM Hybridisierungssonden-Oligonukleotid, und 2 µl chromosomale DNA im Endvolumen von 20 µl.

Nach initialer Denaturierung von 10 min Dauer bei 95°C um die Fast Start *Taq* DNA Polymerase zu aktivieren, wurde der Amplifizierungsprozess in 40 Zyklen durchgeführt, die jeweils folgendermaßen abliefen: Erhitzung um 20°C/s bis auf 95°C mit anschließendem 10 Sekunden andauerndem Verweilen bei dieser Temperatur, dann Abkühlen um 20°C/s bis auf 50°C, mit anschließendem 10 Sekunden andauerndem Verweilen bei dieser Temperatur, gefolgt von erneuter Erhitzung um 20°C/s bis 72°C mit anschließendem 20 Sekunden

¹ [FAM], Fluoreszein; [Red 640], LightCycler-Red 640-*N*-Hydroxysuccinimid Ester; [Red 705], LightCycler-Red 705-Phosphoramidit; Ph, 3'-Phosphat.

andauerndem Verweilen bei dieser Temperatur. Die Fluoreszenzwerte jedes Kapillargefäßes wurden bei 640nm und 705nm (dual-color Option) gemessen.

2.2.3 Nachweis von PBP2a

Der Nachweis von PBP2a mittels Agglutination erfolgte nach Herstellerangaben (Slidex® MRSA Detection, bioMérieux, Nürtingen):

Zuerst erfolgte die Extraktion von PBP2a: Das Innere von zwei sterilen 1,5-µl- Ösen (1 mm Innendurchmesser), wurde vollständig mit isolierten Kolonien gefüllt und überschüssiges Material durch Streichen der Öse über die Agaroberfläche entfernt. Vier Tropfen Extraktionsreagenz 1 (R3) wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Jede gefüllte Öse wurde in das Mikrozentrifugenröhrchen mit dem Reagenz R3 eingebracht und homogenisiert, bis sich alle Zellen von der Öse gelöst hatten. Das Röhrchen wurde verschlossen und für drei Minuten auf einen Heizblock bei 95°C bis 100°C gestellt, anschließend herausgenommen und auf Raumtemperatur abgekühlt.

Eine Tropfen Extraktionsreagenz 2 (R4) wurde in das Röhrchen gegeben und gut homogenisiert, anschließend wurde 5 min bei 1500 × g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde als Probe verwendet.

Anschließend erfolgte die Latex-Agglutination: Die Latexreagenzien wurden resuspendiert, Bläschen im Tropfer beseitigt. Für jede zu testende Probe wurde ein Kreis der Testkarte zum Testen mit sensibilisiertem Latex (R1) und ein Kreis zum Testen mit negativer Latexkontrolle (R2) ausgewählt und gekennzeichnet. Ein Tropfen sensibilisierter Latex (R1) wurde in den Testkreis gegeben, dann 50 µl Probe zugeben und mit dem Mischspatel gut vermischt und über die gesamte Kreisoberfläche verteilt. Auf dieselbe Art wurde ein Tropfen negative Latexkontrolle (R2) in den Kontrollkreis gegeben, dann 50 µl Probe zugegeben, vermischt und über die gesamte Kreisoberfläche verteilt. Die Testkarte wurde manuell drei Minuten lang gedreht und auf das Auftreten einer Agglutination beobachtet. Das Testergebnis wurde

als positiv bewertet, wenn beim sensibilisierten Latex (R1), nicht aber bei der negativen Latexkontrolle (R2) eine Agglutination zu beobachten war.

2.2.4 Nachweis des lukS-PV-Gens

Der Nachweis des lukS-PV-Gens erfolgte nach Reischl [63]:

Unter Verwendung des LightCycler® Geräts von Roche (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde mittels real-time PCR ein spezifisches, 124-bp großes Fragment innerhalb des lukS-PV Gens nachgewiesen.

Die chromosomale DNA der jeweiligen Stämme wurde mithilfe eines einfachen, schnellen Erhitzungsprozesses extrahiert [64]. Die für die Amplifizierung und den Sequenz-spezifischen Nachweis des lukS-PV Genfragments benötigten Oligonukleotid Primer und fluoreszierende LightCycler®-Hybridisierungssonden wurden von TIB Molbiol (Berlin) bezogen. Es handelte es sich hierbei um folgende Oligonukleotide:

Das Primerpaar SaLuk-UF3 (Sequenz: AAGGCTCAGGAGATACAAGTG; Nukleotidposition: 1798–1818; Genbankzugangnummer: X72700) und SaLuk-UR3 (Sequenz: TCACTTCATATTTAACTGTGTAATTTTC; Nukleotidposition: 1933–1959; Genbankzugangnummer: X72700), sowie das Sondenpaar SaLuk-HP-1 (Sequenz: CAACACACTATGGCAATAGTT-[FL]; Nukleotidposition: 1873–1893; Genbankzugangnummer: X72700) und SaLuk-HP-2 (Sequenz: [Red640]-TTTAGAAGGATCTAGAATACACAAGGC-[Ph]; Nukleotidposition: 1895–1921; Genbankzugangnummer: X72700)¹.

Der Amplifizierungsmix enthielt 4 µl LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS Hybridisierungssonden-Mix (Roche Diagnostics, Mannheim), 2 mM MgCl₂ (Gesamtkonzentration), je 0,5 µM SaLuk-UF-3/-UR-3 Primer-Oligonukleotid, je 0,2 µM

¹ [FL], Fluoreszin; [Red640], LightCycler Red 640; [Ph], 3'- Phosphat

SaLuk-HP-1/-2 Hybridisierungssonden-Oligonukleotid, und 2 µl chromosomale DNA im Endvolumen von 20 µl.

Nach initialer 10-minütiger Denaturierung bei 95°C wurde der Amplifizierungsprozess in 45 Zyklen durchgeführt, die jeweils folgendermaßen abliefen: Erhitzung um 20°C/s bis auf 95°C mit anschließendem 10 Sekunden andauerndem Verweilen bei dieser Temperatur, dann Abkühlen um 20°C/s bis auf 55°C, mit anschließendem 10 Sekunden andauerndem Verweilen bei dieser Temperatur, gefolgt von erneuter Erhitzung um 20°C/s bis 72°C mit anschließendem 12 Sekunden andauerndem Verweilen bei dieser Temperatur.

Die Fluoreszenzwerte jedes Kapillargefäßes wurden bei 640nm gemessen und aufgezeichnet zwischen dem Annealing- und dem Elongations-Schritt jedes PCR-Zyklus.

2.2.5 *spa*-Typisierung

Das *spa*-Gen kodiert das *S.aureus*-spezifische Protein A. Die single-locus DNA-Sequenzierung von repeat-regions des *spa*-Gens dient der Typisierung von MRSA.

Die *spa*-Typisierung erfolgte nach Harmsen [65] bzw. www.ridom.de (http://www3.ridom.de/doc/Ridom_spa_sequencing.pdf):

Als erstes erfolgte die Extraktion der DNA: Zur Gewinnung der DNA wurde eine Öse voll Zellen einer Kolonie mit destilliertem Wasser gewaschen und 20 min bei 56°C mit 200 µl 6%iger InstaGene matrix solution (BIO-RAD, München) inkubiert. Die Suspension wurde gevortext, 8 min bei 100°C erhitzt und 2-3 min bei 8,000 × g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µl für die PCR Amplifizierung verwendet.

Anschließend erfolgte die Amplifizierung der DNA: Für die Amplifizierung der *spa*-repeat-region wurde eine PCR in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, welches die gereinigte DNA, 200 µM Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 10 pmol des jeweiligen Primers, 5 µl 10-fach konzentrierten PCR Puffer II (Applied Biosystems,

Darmstadt), 1.5 mM MgCl₂ und 1.25 U *AmpliTaq* DNA Polymerase (Applied Biosystems, Darmstadt) enthielt.

Die PCR-Zyklen wurden wie folgt durchgeführt: Initiale Denaturierung von 5min Dauer bei 80°C, gefolgt von 35 jeweils 45s andauernden Zyklen bei 94°C zur Denaturierung, 45s andauerndem Annealing bei 60°C, und 90s Extension bei 72°C, mit einer einzelnen abschließenden 10-minütigen Extension bei 72°C.

Für die Amplifizierung wurden folgende HPLC¹-gereinigte Primer verwendet:

spa-1113f (Sequenz: TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C; Nukleotidposition: 1092-1113; Genbankzugangsnummer: J01786) und spa-1514r (Sequenz: CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT; Nukleotidposition: 1534-1514; Genbankzugangsnummer: J01786)

Die DNA Sequenzierung wurde wie folgt durchgeführt: Das PCR-Produkt wurde durch eine enzymatische Methode gereinigt, welche mit Exonuklease I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt-Hoechst) und Shrimp Alkaline Phosphatase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) arbeitet. Kurz, 5 µl des PCR-Produktes wurde mit 1 U des jeweiligen Enzyms bei 37°C 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme bei 80°C 15 min inaktiviert und das PCR-Produkt dann bei 4°C gelagert. Die Amplifikate wurden mit Hilfe des ABI Prism BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) sequenziert. Für die Sequenzierungsreaktion benötigt wurden 1.0 µl Premix aus dem Kit, 1.5 µl TrisHCl/MgCl₂ Puffer (400mM Tris-HCl; 10mM MgCl₂), 10 pmol Sequenzierungs-Primer, und 2 µl des gereinigten PCR-Produktes in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Die gleichen Primer, die auch in der PCR verwendet wurden, wurden auch für das Sequenzieren bei einer Annealing-Temperatur von 60°C verwendet. Alle Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem T1 Thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen) durchgeführt. Es fanden 25 Zyklen mit 10-sekündiger Denaturierung bei 96°C und 4-minütiger Extension bei 60°C statt.

¹ HPLC: "High Performance Liquid Chromatography", Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie.

Die Sequenzierungsprodukte wurden mittels Centri-Sep Spin Columns (Princeton Separations, Adelphia, NJ) gereinigt und nach Herstellerangaben vorbereitet für den ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt).

Für die Spa-Sequenz Analyse wurde die Software Ridom StaphType™ (Ridom GmbH, Würzburg,) verwendet.

2.2.6 Bestimmung des „multi-locus sequence“-Typs (MLST)

Eine weitere Typisierungsmethode stellt das „multi-locus sequence-typing“ dar. Sie wurde von Enright für *S.aureus* modifiziert [66].

Die Bestimmung des „multi-locus sequence“-Typs erfolgte nach Enright bzw. www.mlst.net:

Das MLST-Schema für *S.aureus* verwendet interne Fragmente der folgenden sieben „house-keeping“-Gene: *arcC* (Carbamat Kinase), *aroE* (Shikimat Dehydrogenase), *glpF* (Glycerol Kinase), *gmk* (Guanylate Kinase), *pta* (Phosphat Acetyltransferase), *tpi* (Triosephosphat Isomerase), *yqiL* (Acetyl Coenzyme A Acetyltransferase).

Bei Durchführung der PCR wurden für die genannten Gene folgende Primerpaare verwendet:

- für *arcC*: arc up (TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC)

arc dn (AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG)

- für *aroE*: aro up (ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC)

aro dn (GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC)

- *glpF*: glp up (CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C)

glp dn (TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC)

- *gmk*: gmk up (ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC)

gmk dn (TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA)

- *pta*: pta up (GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG)

pta dn (GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA)

- *tpi*: tpi up (TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA)

tpi dn (TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC)

- *yqiL*: yqi up (CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC)

yqi dn (CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC)

Die DNA-Extraktion erfolgte nach Jordens and Pennington, jedoch in der für *S.aureus* modifizierten Variante, dh. mit Lysostaphin (Sigma) in der Endkonzentration von 30 mg/l beim Lyse-Schritt [67].

Die PCRs wurden mit 50 µl Reaktions-Volumina durchgeführt, welche 0,5 µl (ca. 0,5 µg) chromosomale DNA enthielten, sowie 0,5 µg des jeweiligen Primers, 1 U *Taq* DNA Polymerase (Qiagen, Hilden), 5 µl 10 × Puffer mit *Taq* Polymerase und 0,2 mM Desoxynukleosid Triphosphate (Applied Biosystems, Darmstadt).

Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt: Initiale 5-minütige Denaturierung bei 95°C, gefolgt vom Annealing in 30 Zyklen von 1min Dauer bei 55°C, Extension von 1min Dauer bei 72°C, Denaturierung von 1min Dauer bei 95°C, gefolgt von einer abschließenden 5-minütigen Extension bei 72°C. Die amplifizierten Produkte wurden mit 20%-igem Polyethylene Glykol-2.5 M NaCl ausgefällt, in kaltem 70%-igem Ethanol resuspendiert und wiederausgefällt. Die Sequenzen beider Stränge wurden bestimmt mit einem ABI Prism 377 DNA Sequenzierer mit BigDye Terminators (Applied Biosystems, Darmstadt) und den in der initialen PCR verwendeten Primern.

2.3 Resistenztestung

Sofern nicht anders vermerkt, erfolgte die Resistenztestung nach CLSI (www.clsi.org): Eine Suspension mit der Erregerkonzentration $1,5 \times 10^8$ KBE/ml (~ McFarland-Standard 0,5) wurde hergestellt, indem von CSB zwei bis fünf Kolonien einer frischen Übernachtskultur (siehe unter Stammsammlung) in 3 ml einer sterilen 0,85%igen NaCl-Lösung eingerührt wurden.

Mit der so erstellten Suspension wurden Mueller-Hinton-Agarplatten mittels steriler Wattestäbchen durch systematisches dreifaches Ausstreichen der gesamten Plattenoberfläche in rechtwinklig zueinander stehenden Richtungen beimpft.

2.3.1 Agardiffusion

Die Agardiffusion für Cefoxitin (30 µg-Blättchen) wurde bei 30°C und 35°C durchgeführt.

Die Agardiffusion für Gentamicin (10 µg-Blättchen) und Kanamycin (30 µg-Blättchen) wurde bei 37°C durchgeführt. Die Bebrütungsdauer betrug jeweils 24 h.

2.3.2 Etest®

Die MHK-Bestimmung mittels Etest® für Oxacillin, Cefoxitin, Vancomycin, Fusidinsäure, Clindamycin, Linezolid, Doxycyclin, Moxifloxacin, Tigecyclin, Rifampicin, SXT und Mupirocin erfolgte nach Angaben des Herstellers (AB Biodisk, Solna, Schweden). Die Bebrütungsdauer betrug jeweils 24 h.

Die Mueller-Hinton-Agarplatten für den Oxacillin-Etest® enthielten, wie vom Hersteller verlangt, 2% NaCl.

2.3.3 Oxacillin Agar Screen-Test

Auch der Oxacillin Agar Screen-Test erfolgte nach CLSI-Richtlinien.

Verwendet wurde Mueller-Hinton-Agar mit 4% Kochsalz in zweigeteilten Petrischalen, wobei jeweils eine Plattenhälfte 6 mg/l Oxacillin enthielt. Die andere Plattenhälfte fungierte als Wachstumskontrolle.

Auf der Plattenrückseite wurden ca. 2 cm breite Abschnitte rechtwinklig zur Plattentrennlinie markiert. Jeder Abschnitt wurde für den jeweils getesteten Stamm gekennzeichnet.

Wie oben erklärt wurde eine Suspension mit der Erregerkonzentration $1,5 \times 10^8$ KBE/ml (~ McFarland-Standard 0,5) hergestellt. Mit der so erstellten Suspension wurde pro Isolat jeweils ein Abschnitt der Müller-Hinton-Agarplatten mittels steriler Wattestäbchen beimpft. Das Wattestäbchen wurde hierbei in die Suspension getaucht und anschließend 2,5 – 3 cm lang auf

einer Hälfte des Abschnitts ausgestrichen, dann wieder in die Suspension getaucht und auf der anderen Hälfte des Abschnitts ausgestrichen.

Die Bebrütungsdauer betrug 24 h bei einer Bebrütungstemperatur von 35°C.

Bei der Auswertung wurde das Vorhandensein mindestens einer Kolonie als positives Wachstum bewertet.

2.3.4 Chromogene Nährmedien

Getestet wurden die Medien CHROMagar® MRSA (Kat. Nr. 257308, Becton Dickinson, Heidelberg), chromID MRSA® (vormals MRSA ID, Kat. Nr. 43 451, bioMérieux, Nürtingen), MRSASelect® (Kat. Nr. 63747, Bio-Rad, München) und Chromogener-MRSA-Selektivnährboden von Oxoid (Kat. Nr. PO5083A, OxoidLTD, Hampshire, England). Die Handhabung erfolgte nach Herstellerangaben.

Als Wachstumskontrolle wurde parallel jeder Stamm auf CSB und Mannitol-Kochsalzagar angezüchtet.

Nach frischer Übernachtskultur (siehe unter Stammsammlung) wurde eine Suspension mit McFarland-Standard 0,5 1:1.000 verdünnt und davon 10 µl (~ 1.000 KBE) ausplattiert und bei 37 °C 24 h bzw. 48 h bebrütet.

Bewertet wurden Wachstum („ja“ / „nein“), chromogene Farbreaktion (bezogen auf den Stamm Nr. 50 als Referenz: „stärker“ / „vergleichbar“ / „schwächer“ / „nicht erkennbar“), Koloniegröße („größer“ oder „kleiner als Wachstum auf CSB“), sowie das zusammengefasste Testergebnis („positiv“ oder „negativ“).

2.4 Wachstumseigenschaften

2.4.1 NaCl

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme mit und ohne Zusatz von 10% NaCl wurde indirekt durch Messung der Zunahme der optischen Dichte (OD; 450 nm; Spektra II, Tecan, Crailsheim) in Lysogeny Broth (LB) ermittelt.

Wie unter 3.3 beschrieben, wurde eine Suspension der Dichte 0,5 McFarland hergestellt und 1:1.000 mit LB ohne und mit NaCl (Endkonzentration 10% NaCl) verdünnt. Anschließend wurden in Doppelbestimmungen Mikrotiterplatten mit 200 µl der Suspension beimpft. Die Veränderung der OD wurde nach 2, 4, 5, 6 und 24 Stunden mit dazwischen liegender Bebrütung bei 37°C bestimmt.

2.4.2 Koloniemorphologie bei 37°C und 42°C

Von einer frischen Übernachtskultur wurden je nach Koloniedurchmesser 1 bis 3 Kolonien entnommen, ein Drei-Ösen-Ausstrich auf CSB angefertigt, und in einer Feuchten Kammer bei 37°C und 42°C übernacht bebrütet.

Beurteilt wurden nach Augenmaß im direkten Vergleich, bezogen auf das Verhalten bei 37 °C: (1) Koloniedurchmesser („abnehmend“, „gleich bleibend“, „zunehmend“), (2) gelbe Pigmentierung („abnehmend“, „gleich bleibend“, „zunehmend“) und (3) Hämolyseverhalten („abnehmend“, „gleich bleibend“, „zunehmend“, wobei als stärkste Form der Hämolyse „Hämolyse mit 2 Diffusionslinien“ gewertet wurde, gefolgt von „Hämolyse mit einer Diffusionslinie“, „inkomplette Hämolyse“ und „keine Hämolyse“).

2.4.3 Hitzetoleranz

Gesucht wurde die höchste Bebrütungstemperatur, die noch Wachstum im Flüssigmedium zuließ. Wie unter „Resistenztestung“ beschrieben, wurde eine Suspension der Dichte

0,5 McFarland hergestellt, welche anschließend 1:1.000 verdünnt wurde. Davon wurden 500 µl entnommen und im Thermomixer (600 U/min; Eppendorf, Hamburg) 18 h bei der jeweiligen Temperatur bebrütet. Anschließend wurden 100 µl auf CSB ausplattiert und übernacht bei 37°C bebrütet. Das Wachstum mindestens einer Kolonie wurde als „positiv“ gewertet. Ausgehend von 37°C und 60°C als Temperaturen mit und ohne Wachstum wurde in einem iterativen Verfahren die nächste Wachstumsbestimmung bei der Temperatur durchgeführt, die den Mittelwert der Ausgangstemperaturen darstellte.

2.5 Herstellung der Nährmedien

Mit Ausnahme der chromogenen Nährmedien erfolgte die Herstellung aller übrigen Nährmedien durch die Nährbodenküche des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg.

2.5.1 *Columbia Schafblutagar (CSB)*

Columbia-Agar-Basis (Kat. Nr. 1.10455, VWR International GmbH, vormals Merck, Darmstadt), 40 g/l.

Schafblut aus Lebewesen, steril, defibriniert, 80 ml/l.

2.5.2 *Müller-Hinton-Agarplatten*

Müller-Hinton-Agar (Kat. Nr. CM 0337, Oxoid LTD, Hampshire, England), 38 g/l.

Die Mueller-Hinton-Agarplatten für den Oxacillin-Etest® enthielten 2% NaCl:

NaCl (Kat. Nr. 1.06404, VWR International GmbH, vormals Merck, Darmstadt), 20 g/l.

Für den Oxacillin Agar Screen-Test wurde Mueller-Hinton-Agar mit 4% Kochsalz in zweigeteilten Petrischalen verwendet, wobei jeweils eine Plattenhälfte 6 mg/l Oxacillin enthielt:

NaCl (Kat. Nr. 1.06404, VWR International GmbH, vormals Merck, Darmstadt), 40 g/l.

Oxacillin Stammlösung, 1Rö/l.

2.5.3 Mannitol-Kochsalzagar

Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar (Kat. Nr. 1.05404, VWR International GmbH, vormals Merck, Darmstadt), 108 g/l.

2.5.4 Chromogenen Nährböden

CHROMagar® MRSA (Kat. Nr. 257308, Becton Dickinson, Heidelberg)

chromID MRSA®, vormals MRSA ID (Kat. Nr. 43 451, bioMérieux, Nürtingen)

MRSASelect® (Kat. Nr. 63747, Bio-Rad, München)

Chromogener-MRSA-Selektivnährboden von Oxoid (Kat. Nr. PO5083A, Oxoid LTD, Hampshire, England)

2.5.5 Lysogeny Broth (LB)

LB Bouillon (Kat. Nr. X968.3, Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 25 g/l.

2.6 Statistische Berechnungen

Zur Berechnung der statistischen Größen wurde das Programm SPSS 15.0 für Windows verwendet.

Zum Vergleich der Nachweismethoden wurde der McNemar-Test für verbundene und der Chi²-Test für unverbundene Stichproben angewandt.

Die Verteilung der MHK-Werte wurde mit dem Mann-Whitney-Test untersucht

3 Ergebnisse

3.1 Resistenztestung bei MRSA mit und ohne PVL

3.1.1 Erkennung der Oxacillinresistenz von *S. aureus* mit positivem *mecA*-Gen-Nachweis durch verschiedene Methoden der Resistenztestung

Als Goldstandard zur Erkennung der Methicillin-Resistenz bei *S. aureus* wurde kombiniert der Nachweis des *mecA*-Gens mittels PCR und des alternativen Penicillin-Bindeproteins PBP2a mittels Agglutination benutzt. Beide Methoden waren vollständig konkordant.

Mit diesem Goldstandard wurden verschiedene Methoden zur Resistenztestung verglichen.

Diese Methoden erkannten die Methicillin-Resistenz bei 79,4–97,1% der getesteten 34 MRSA-Isolate, wobei die Methoden der Cefoxitin-Agardiffusion bei 30°C und 35°C unabhängig von den verwendeten Grenzwerten, CHROMagar® MRSA nach 48 h sowie chromID MRSA® nach 48 h mit jeweils 97,1% abschnitten (Unterschied zum *mecA*-Nachweis nicht signifikant; McNemar-Test, $\chi^2 = 0,25$). Auch der Chromogene MRSA-Selektivnährboden, die MHK-Bestimmung von Oxacillin bzw. Cefoxitin (Etest®) sowie der Nährboden MRSASelect® waren mit 94,1%, 91,2%, 91,2% und 88,2% Detektionsrate nicht signifikant schlechter ($\chi^2 = 1,13$; 2,08; 2,08; 3,06). Der Oxacillin Agar Screen nach CLSI war mit 79,4% im Vergleich zum *mecA*-Gennachweis signifikant schlechter ($\chi^2 = 6,04$; $P < 0,014$). Werden bei den Chromplatten „schwach pigmentierte Kolonien“ und bzw. oder „schwaches Wachstum“ mit in die Auswertung einbezogen, so erreichen die vier verschiedenen chromogenen Medien (CHROMagar® MRSA, chromID MRSA®, MRSASelect und Chromogener-MRSA-Selektivnährboden) nach 48 h eine Nachweisrate von 97,1%, 97,1%, 91,1% und 94,1%. Weitere Details finden sich in **Tabelle 2**. Zwischen MRSA mit und ohne PVL gab es bei keiner der untersuchten Methoden einen signifikanten Unterschied.

Tab. 2. Erkennung der Oxacillinresistenz von *S. aureus* mit positivem *mecA*-Gen-Nachweis durch verschiedene phänotypische Methoden. Alle Methoden erkannten 3 Kontrollstämme (#35, #56, #58) ohne *mecA*-Gen als oxacillin-sensibel. PVL: Pantone-Valentine Leukozidin.

Method	G*	T/BD**	W***	MRSA ohne PVL (n = 9)	%	MRSA mit PVL (n = 25)	%	MRSA insgesamt (n = 34)	%
PBP2a (Agglutination)				9	100	25	100	34	100
Oxacillin Agar Screen	CLSI	24 h		7	77,8	20	80,0	27	79,4§
Oxacillin MHK	Eitest®	24 h		8	88,9	23	92,0	31	91,2
Cefoxitin MHK	Eitest®	24 h		8	88,9	23	92,0	31	91,2
Cefoxitin Agardiffusion	CLSI	24 h, 30 °C		8	88,9	25	100,0	33	97,1
		24 h, 35 °C		9	100	24	96,0	33	97,1
	Felten [57]	24 h, 30 °C		8	88,9	25	100,0	33	97,1
		24 h, 35 °C		9	100	24	96,0	33	97,1
CHROMagar® MRSA		24 h	+	6	66,7	22	88,0	28	82,4§
			(+)	2	22,2	0	/	2	5,9
			—	1	11,1	3	12,0	4	11,8
		48 h	+	9	100	24	96,0	33	97,1
			(+)	0	/	0	/	0	/
			—	0	/	1	4,0	1	2,9
chromID MRSA®		24 h	+	8	88,9	22	88,0	30	88,2
			(+)	0	/	1	4,0	1	2,9
			—	1	11,1	2	8,0	3	8,8
		48 h	+	9	100	24	96,0	33	97,1
			(+)	0	/	0	/	0	/
			—	0	/	1	4,0	1	2,9
MRSASelect®		24 h	+	7	77,8	22	88,0	29	85,3§
			(+)	1	11,1	1	4,0	2	5,9
			—	1	11,1	2	8,0	3	8,8
		48 h	+	8	88,9	22	88,0	30	88,2
			(+)	0	/	1	4,0	1	2,9
			—	1	11,1	2	8,0	3	8,8
Chromogener MRSA- Selektivnährboden		24 h	+	8	88,9	22	88,0	30	88,2
			(+)	1	11,1	1	4,0	2	5,9
			—	0	/	2	8,0	2	5,9

*Grenzwerte; **T/BD: Temperatur, Bebrütungsdauer; *** Wachstum als: + : Pigmentierte Kolonien; (+) : Schwach pigmentierte Kolonien und/oder schwaches Wachstum; — : Kein Wachstum oder keine Pigmentierung; /: Nicht vorhanden; §: Signifikant schlechter als der Goldstandard (McNemar-Test, P < 0,05).

Für diejenigen Stämme, die durch die oben genannten Resistenztests nicht erkannt wurden, wurden die MHK-Werte für Oxacillin und Cefoxitin aufgeschlüsselt. Die Auswertung ergab, dass die nicht erkannten Stämme ausnahmslos MHK-Werte aufwiesen, die unterhalb oder nahe der im jeweiligen Test benutzten Grenzwerte lagen: Beim Oxacillin-Agar-Screen bzw. Oxacillin Etest® betrug die MHK-Werte der nicht erkannten Stämme für Oxacillin 0,38–6 mg/l bzw. 0,38–2 mg/l; beim Cefoxitin Etest®, bei der Cefoxitin Agardiffusion bzw. bei den chromogenen Nährmedien betrug die Cefoxitin-MHK der nicht erkannten Stämme jeweils 1,5–3 mg/l.

Für die chromogenen Medien wurden zusätzlich die Koloniegröße und die Ausprägung der Pigmentierung beurteilt, die für die Einstufung eines positiven Ergebnisses wichtig sind. Für den Vergleich wurden die Stämme auf CSB und Mannitol-Kochsalzagar angezüchtet. Im Vergleich zum Wachstum auf CSB war nach 24 h und 48 h die Koloniegröße bei chromID MRSA® „gleich groß“ oder „größer“, bei CHROMagar MRSA® „vergleichbar“, und „kleiner“ bei MRSASelect® und Chromogener-MRSA-Selektivnährboden MRSA-Selektiv. In der vorliegenden Untersuchung mit Reinkulturen hatte die Größe der Kolonien keinen Einfluss auf die Ablesbarkeit der Resultate. Generell erleichterte die Diffusion des Pigments in den Agar die Erkennung von positiven Ergebnissen. Die Stärke der Farbreaktion stand in keinem abhängigen Verhältnis zum Koloniedurchmesser. Bei einem PVL-negativen MRSA-Stamm fand sich auf den Medien CHROMagar MRSA® und chromID MRSA® nach 24 h keine Pigmentierung bei gleichzeitig äußerst schwachem Wachstum. Nach 48 h zeigte das Isolat dann die typische Pigmentierung bei normalem Wachstum. „Schwache“ Pigmentierung nach 48 h war für chromID MRSA® in einem Fall und für MRSASelect® in zwei Fällen zu verzeichnen.

3.1.2 *MHK₉₀-Werte (90 %-Perzentile) bzw. Hemmhofdurchmesser von MRSA mit und ohne PVL für verschiedene Antibiotika*

Im Vergleich von PVL-positiven und PVL-negativen MRSA fielen für MRSA mit PVL die MHK-Werte für die folgenden Antibiotika signifikant niedriger aus ($p < 0,05$; Mann-Whitney-Test): Oxacillin, Cefoxitin, Clindamycin, Moxifloxacin und SXT. Für die Substanzen Vancomycin, Fusidinsäure, Linezolid, Doxycyclin, Tigecyclin, Rifampicin, Mupirocin und Gentamicin bzw. Kanamycin wurde kein signifikanter Unterschied in der Empfindlichkeit beobachtet. Details finden sich in **Tabelle 3**. Die Verteilung der MHK-Werte (mg/l) von Oxacillin für MRSA mit und ohne PVL war wie folgt: MRSA mit PVL: 0,38 ($n = 1$), 0,5 ($n = 1$), 6 ($n = 5$), 8 ($n = 3$), 12 ($n = 2$), 16 ($n = 2$), 24 ($n = 6$), 32 ($n = 3$), 48 ($n = 1$), 512 ($n = 1$); MRSA ohne PVL: 2 ($n = 1$), 6 ($n = 1$), 16 ($n = 1$), 512 ($n = 6$).

Tab. 3. MHK₉₀-Werte (90 %-Perzentile) bzw. Hemmhofdurchmesser von MRSA mit und ohne PVL für verschiedene Antibiotika.

Methode	MRSA ohne PVL (n = 9)	MRSA mit PVL (n = 25)	MRSA insgesamt (n = 34)	Signifikanz*
MHK₉₀ (mg/l)				
Oxacillin	512	32	512	0,033**
Cefoxitin	512	24	128	0,033**
Vancomycin	1,5	1,5	1,5	0,96
Fusidinsäure	0,125	4	4	0,1
Clindamycin	512	0,094	512	0,001**
Linezolid	1,5	1,5	1,5	0,2
Doxycyclin	0,19	2	2	0,2
Moxifloxacin	8	64	64	0,03**
Tigecyclin	0,19	0,19	0,19	0,56
Rifampicin	64	0,012	0,012	0,23
SXT	0,094	0,047	0,064	0,05**
Mupirocin	0,19	0,19	0,19	0,93
HHD₉₀* (mm)				
Gentamicin	23	26	26	0,8
Kanamycin	23	25	24	0,96

HHD₉₀: Hemmhofdurchmesser; * MRSA ohne bzw. mit PVL, Mann-Whitney-Test; **Signifikant, < 0,05

3.2 Vergleich der Wachstumseigenschaften

3.2.1 NaCl-Toleranz

Die Zugabe von 10% NaCl führte bei allen MRSA-Stämmen nach 6 h und 24 h im Vergleich zur Wachstumskontrolle ohne NaCl zu einer verminderten Zunahme der OD (Median —4,8% bzw. 23,7% im Vgl. zur Wachstumskontrolle). Zwischen MRSA mit und ohne PVL gab es keinen signifikanten Unterschied (24 h-Wert; $P = 0,06$; Mann-Whitney-Test).

3.2.2 Veränderung der Koloniemorphologie bei 42°C im Vergleich zu Wachstum bei 37°C

Bei 42°C fand sich zwischen den MRSA-Stämmen mit und ohne PVL bezüglich Koloniedurchmesser und Pigmentierung kein Unterschied. MRSA-Stämme mit PVL sowie die 3 MSSA-Stämme zeigten bei einem 1/3 der Stämme eine verstärkte Hämolyse, während MRSA ohne PVL keine Veränderung zeigten. Im Vergleich zur Standard-Bebrütungstemperatur von 37°C blieben die Koloniedurchmesser bei 42°C größtenteils gleich, lediglich in je einem Fall vergrößerten (MRSA ohne PVL) bzw. verkleinerten (MSSA) sich die Durchmesser deutlich. Pigmentierung und Hämolyseverhalten waren in keinem Fall abgeschwächt.

3.2.3 Hitzetoleranz

Die höchste Temperatur, welche noch Wachstum zuließ, reichte bei den einzelnen Stämmen von 46°C bis 51°C. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen MRSA mit oder ohne PVL bzw. MSSA.

4 Diskussion

CA-MRSA gelten als „emerging pathogen“ und sind z. B. in den USA mittlerweile zum häufigsten Verursacher von ambulant erworbenen Haut-/Weichteilinfektionen geworden [68]. In Deutschland sind (CA-)MRSA mit PVL noch selten (2006 3,1 % aller MRSA-Isolate des Nationalen Referenzzentrums für Staphylokokken [69]), sollten jedoch wegen der hohen Morbidität, den Konsequenzen in der Therapie und Hygiene sowie der epidemiologischen Bedeutung sicher erkannt werden [31].

Auf die Schwierigkeiten bei der Erkennung von MRSA wurde verschiedentlich hingewiesen [50], [59]. Die Schwierigkeiten betreffen die korrekte Speziesdiagnostik (in dieser Arbeit nicht untersucht) sowie das Problem der zuverlässigen Induktion bzw. der Heteroresistenz zur Erkennung der Oxacillinresistenz. Bei MRSA mit PVL tritt eine zusätzliche Schwierigkeit auf, da die MHK-Werte für Oxacillin im Mittel niedriger sind als bei HA-MRSA [36].

Der Nachweis des *mecA*-Gens mittels PCR bzw. des alternativen Penicillinbindeproteins PBP2a über spezifische latexgebundene Antikörper weist eine hohe Sensitivität und Spezifität auf, steht jedoch aus organisatorischen oder finanziellen Gründen nicht in jedem Fall zur Verfügung. Beide Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit als Goldstandard verwendet und wiesen eine 100%ige Übereinstimmung auf.

Im Vergleich zum Goldstandard erwiesen sich in dieser Untersuchung von 34 unterschiedlichen MRSA-Isolaten die folgenden Methoden bzgl. Sensitivität als nicht signifikant schlechter: Cefoxitin-Agardiffusion bei 30°C und 35°C unabhängig von den verwendeten Grenzwerten nach 24 h (siehe Abb. 1, folgende Seite), CHROMagar® MRSA sowie chromID MRSA® nach 48 h Bebrütung mit jeweils 97,1% (McNemar-Test, $\chi^2 = 0,25$), Chromogener MRSA-Selektivnährboden nach 48 h Bebrütung, die MHK-Bestimmung mittels Etest® für Oxacillin bzw. Cefoxitin sowie der Nährboden MRSASelect® nach 48 h Bebrütung mit 94,1%, 91,2%, 91,2% und 88,2% Detektionsrate ($\chi^2 = 1,13; 2,08; 2,08;$

3,06). Dagegen schnitten der CHROMagar® MRSA, MRSASelect® mit 82,4% und 85,3% nach 24 h sowie der Oxacillin Agar Screen nach CLSI mit 79,4% nach 24 h Bebrütungsdauer im Vergleich zum *mecA*-Nachweis signifikant schlechter ab ($\chi^2 = 5,04; 4,05; 6,04$). Zwischen MRSA mit und ohne PVL bestand kein statistisch bedeutender Unterschied (vgl.Tab. 2).

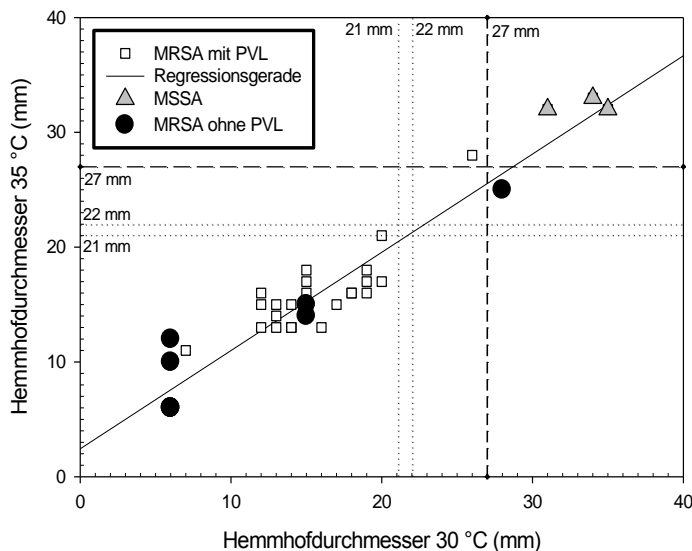


Abb. 1. Verteilung der Hemmhofdurchmesser von 25 MRSA mit PVL und 9 MRSA ohne PVL sowie 3 MSSA und Grenzwerte nach CLSI (21 mm) bzw. Felten (27 mm) für Cefoxitin-Agardiffusion bei 30°C und 35°C Bebrütungstemperatur.

Unsere Ergebnisse zur mangelnden Sensitivität von Oxacillin-basierten Nachweismethoden nach 24 h decken sich mit den Beobachtungen anderer Autoren [50], [70], [71], Übersicht bei [72]. Nach Ansicht dieser Autoren kann die eingeschränkte Sensitivität und Spezifität Oxacillin-basierter Medien nach 24 h auf die Heterogenität der Expression bzw. eine unzureichende Induktion zurückgeführt werden.

Demgegenüber hat sich Cefoxitin in verschiedenen Studien sowohl in der Blättchen- als auch der Agardiffusion als zuverlässige Substanz zum Nachweis der Oxacillin-Resistenz erwiesen [57], [73], [74], [75].

Cefoxitin wird seit 2005 auch von CLSI zum Nachweis der Oxacillin-Resistenz empfohlen. Die Zuverlässigkeit Cefoxitin-basierter Methoden zeigten auch unsere Ergebnisse mit einer Sensitivität von 97,1% für die Agardiffusion mit Cefoxitin. Bei beiden Bebrütungs-temperaturen, 30°C und 35°C, wurde jeweils ein anderer MRSA-Stamm mit der Cefoxitin-Blättchentestung nicht erkannt (ein Stamm mit und ein Stamm ohne PVL, Cefoxitin-MHK 1,5 bzw. 3 mg/l; vgl. Abb. 1). Die niedrigen MHK-Werte dieser Stämme für Cefoxitin sprechen dafür, dass die Schwierigkeit bei der Erkennung nicht mit einer unzureichenden Induktion (und damit den Testbedingungen) zusammenhängt, sondern dass offenkundig auf Resistenztestung beruhende Methoden *S. aureus*-Isolate mit und ohne *mecA*-Gen nicht in jedem Fall voneinander abgrenzen können.

Eine kleine Zahl von MRSA mit und ohne PVL wiesen überraschend niedrige MHK-Werte für Oxacillin auf (0,38–6 mg/l). Niedrige Oxacillin-MHK-Werte werden insbesondere bei SCC*mec*-Kassetten vom Typ IV und V häufig beobachtet [36]. Auch im Vergleich der MHK₉₀-Werte für Oxacillin wiesen MRSA mit PVL niedrigere Werte auf als MRSA ohne PVL.

Zur Spezifität der MRSA-Nachweismethoden können in der vorliegenden Studie aus verschiedenen Gründen keine Aussagen gemacht werden: 1. war die Anzahl von untersuchten MSSA in dieser Studie klein ($n = 3$), und 2. wurde die Identifizierung von *S. aureus* in Abgrenzung zu anderen Bakterienspezies mittels der chromogenen Agarplatten nicht untersucht.

Bei allen vier chromogenen Medien lag die Sensitivität nach 24 h Bebrütung knapp unter 90% und stieg nach verlängerter Bebrütungsdauer (48 h) auf bis zu 96% (vgl. Tabelle 2). Die Verbesserung der Sensitivität durch verlängerte Bebrütung wurde auch von anderen Autoren berichtet und wird in der Regel durch eine Verschlechterung der Spezifität erkauft [76], [77], [78].

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Cefoxitin-Agardiffusion sowie die Chromplatten chromID MRSA® und Chromogener MRSA-Selektivnährboden nach 24 h vergleichbar gute Ergebnisse zur Erkennung der Oxacillinresistenz liefern (unter Nicht-Berücksichtigung der Spezifität). Auch Oxacillin- und Cefoxitin-Etest® liefern vergleichbare Ergebnisse. Der Oxacillin Agar Screen nach CLSI liefert nach 24 h keine verlässlichen Ergebnisse.

Zur Sensitivität des Nachweises von MRSA aus klinischen Proben mittels der in dieser Studie untersuchten selektiven chromogenen Medien liegt eine Reihe von Studien vor, in denen zur Sensitivität Werte von 59% bis 96% dokumentiert sind [78], [79], [80], [81].

Diese klinischen Studien sind mit der vorliegenden Studie nicht vergleichbar, deren Besonderheit gerade darin besteht, dass ein selektiertes Panel von (klinischen) *S. aureus*-Isolaten mit PVL aus unterschiedlicher Herkunft verwendet wurde (vgl. Ergebnisse zur *spa*-Typisierung, Tab. 1). MRSA mit PVL unterscheiden sich von herkömmlichen MRSA u. a. in der Epidemiologie, Virulenz, Pathogenität, SCC*mec*-Kassette, der Oxacillin-MHK und der Resistenzlage gegen Nicht- β -Lactam-Antibiotika [36].

Das Ergebnis dieser Studie zeigt, dass Cefoxitin-basierte Nachweismethoden sowie die MHK-Bestimmung von Oxacillin sowie die chromogenen Nährböden chromID MRSA® und Chromogener MRSA-Selektivnährboden nach 24 h MRSA mit oder ohne PVL gleichermaßen gut erkannten.

MRSA mit PVL wiesen im Vergleich zu MRSA ohne PVL signifikant niedrigere MHK-Werte gegen Oxacillin, Cefoxitin, Clindamycin und SXT auf (Tab. 3). Dieser Befund bestätigt publizierte Daten, dass MRSA mit PVL seltener einen multiresistenten Phänotyp aufweisen und meist eine SCC*mec*-Kassette vom Typ IV oder V aufweisen. Auffallenderweise waren für Moxifloxacin die MHK-Werte von MRSA mit PVL signifikant höher. Dieser Befund könnte auf einen hohen Selektionsdruck durch Chinolone im ambulanten Bereich hinweisen. Bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Fusidinsäure wiesen MRSA mit und ohne PVL keinen signifikanten Unterschied auf. Wie erwartet waren

die MHK-Werte für Linezolid, Doxycyclin, Tigecyclin, Rifampicin, Vancomycin, SXT, Mupirocin und die Resistenzlage für die Aminoglykoside für beide Gruppen von Isolaten ohne signifikanten Unterschied.

Im Vergleich der Wachstumseigenschaften (Toleranz gegenüber NaCl bzw. Hitzetoleranz) zeigte sich kein Unterschied zwischen MRSA mit und ohne PVL. Dieses Ergebnis passt zu dem Befund, dass MRSA mit und ohne PVL polyklonal entstehen [82], und deswegen einseitige Merkmalsausprägungen unwahrscheinlich sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zum Unterschied von MRSA mit und ohne PVL müssen mit Vorbehalt interpretiert werden, da in beiden Gruppen nur eine vergleichsweise geringe Anzahl von Stämmen getestet wurde. Allerdings wurden die derzeit wichtigsten Epidemiestämme von MRSA mit PVL (Nr. 5, 13, 32, 47, 50, 52, 53; Tab. 1) eingeschlossen.

5 Zusammenfassung

S. aureus ist einer der bedeutendsten Erreger bakterieller Infektionen. Er ist äußerst weit verbreitet und ist besonders in gesundheitlichen Einrichtungen zu einem Problem geworden (KISS; www.nrz-hygiene.de). Doch nicht nur aufgrund der Häufigkeit seines Auftretens, sondern auch aufgrund seiner Virulenz und Anpassungsfähigkeit stellt *S. aureus* eine klinische Herausforderung dar [5]. Krankheitsbilder reichen von nicht selten rezidivierenden, pyogenen Infektionen bis hin zu schweren systemischen Erkrankungen mit hoher Letalität. Über die Jahre entwickelten sich überdies zahlreiche neue *S. aureus*-Varianten, welche wie der bekannte MRSA oft mehrere Antibiotikaresistenzen aufweisen, was die Behandlung zusätzlich anspruchsvoller gestaltet. Umso bedeutender ist daher die zügige Einleitung einer adäquaten Therapie, welche eine möglichst rasche, korrekte Diagnostik voraussetzt.

Als Goldstandard der MRSA-Diagnostik gilt der Direktnachweis des *mecA*-Gens mittels PCR bzw. der Nachweis des Genprodukts von *mecA*, PBP2a, durch monoklonale Antikörper. Diese Methoden liefern zuverlässige Ergebnisse innerhalb weniger Stunden [51], stehen jedoch aus organisatorischen oder finanziellen Gründen nicht in jedem Fall zur Verfügung.

Verfahren zur Testung der Oxacillinresistenz sind kostengünstiger und erfordern weniger technischen Aufwand, weshalb sie in der MRSA-Diagnostik als Routinemethoden gelten. Sie sind jedoch zeitaufwendiger und haben den Nachteil, dass im Einzelfall eine korrekte Diagnose durch im Mechanismus der Oxacillinresistenz begründete Probleme erschwert werden kann.

Seit einigen Jahren wird weltweit eine neue Variante von MRSA beobachtet, die außerhalb von Krankenhäusern bei Patienten ohne Risikofaktoren auftritt [23], und deswegen auch „community associated“-MRSA genannt wird. CA-MRSA tragen häufig den Pathogenitätsfaktor PVL und sind oft nur gegen wenige Antibiotikastanzklassen resistent. Sie sind meist heteroresistent und weisen manchmal MHK-Werte für Oxacillin auf, die im

Mittel niedriger sind als bei HA-MRSA [36], was wie oben erwähnt Schwierigkeiten bei der Resistenztestung mit sich bringen kann.

Es stellt sich also die Frage, ob CA-MRSA zuverlässig mit Routinemethoden zur Resistenztestung bzw. MRSA-Screening erkannt werden.

Anhand einer Auswahl von 37 *S. aureus*-Stämmen (MRSA mit PVL: $n = 25$; MRSA ohne PVL: $n = 9$; MSSA: $n = 3$) wurden verschiedene auf der Resistenztestung beruhende Methoden zur Diagnostik von MRSA untersucht: Oxacillin Agar Screen nach CLSI, Bestimmung der MHK für Oxacillin und Cefoxitin mittels Etest®, Agardiffusion mit Cefoxitin, sowie die chromogenen Nährmedien „CHROMagar® MRSA“, „chromID MRSA®“, „MRSASelect®“ und „Chromogener MRSA-Selektivnährboden“.

Um zu untersuchen, ob möglicherweise Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeit bei anderen Antibiotika bestehen, erfolgte außerdem die Ermittlung der MHK für Vancomycin, Fusidinsäure, Clindamycin, Linezolid, Doxycyclin, Moxifloxacin, Tigecyclin, Rifampicin, SXT und Mupirocin mittels Etest®, sowie mittels Agardiffusion für Gentamicin und Kanamycin. Zusätzlich wurden die NaCl-Toleranz, die Hitzetoleranz, sowie phänotypisch zu beobachtende Wachstumsveränderungen bei 42°C im Vergleich zu 37°C bestimmt, um ein eventuell unterschiedliches Wachstumsverhalten von MRSA mit bzw. ohne PVL unter verschiedenen Kulturbedingungen zu untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MRSA mit PVL im Vergleich zu MRSA ohne PVL (1) niedrigere MHK-Werte für Oxacillin, Cefoxitin, Clindamycin und SXT aufweisen, (2) selten einen multiresistenten Phänotyp zeigen, (3) sich in allgemeinen Wachstumseigenschaften (Pigmentierung auf Chrom-Platten, Salztoleranz, Hitzetoleranz) nicht unterscheiden, (4) durch die folgenden Methoden gleichermaßen als methicillinresistent erkannt werden können: *mecA*-Genachweis, PBP2a-Antigennachweis, Oxacillin-MHK, Cefoxitin-MHK, Cefoxitin-Blättchendiffusion, chromogene Nährböden chromID MRSA® und Chromogener MRSA-Selektivnährboden (jeweils innerhalb 24 h).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Tauglichkeit der einzelnen phänotypischen Methoden müssen mit Vorbehalt interpretiert werden. Zum einen wurde lediglich deren Sensitivität untersucht, zur Spezifität können keine Aussagen gemacht werden. Zum anderen sind die Ergebnisse zur Sensitivität der untersuchten Medien nicht vergleichbar mit Ergebnissen anderer Studien des Nachweises von MRSA aus klinischen Proben, weil als Besonderheit dieser Arbeit ein speziell selektiertes Panel von (klinischen) *S. aureus*-Isolaten mit PVL aus unterschiedlicher Herkunft verwendet wurde. Des Weiteren wurde pro Gruppe nur eine geringe und verschieden große Anzahl von Stämmen getestet.

Unsere Ergebnisse bezüglich Cefoxitin decken sich mit Ergebnissen anderer Studien, die Cefoxitin Zuverlässigkeit beim Nachweis der Oxacillin-Resistenz bescheinigen [57], [73], [74], [75]. Beobachtungen anderer Autoren zur mangelnden Sensitivität Oxacillin-basierter Nachweismethoden nach 24 h können durch unsere Ergebnisse ebenfalls bestätigt werden [50], [70], [71]. Dieses Phänomen mag unter anderem auf die Heterogenität der Expression bzw. eine unzureichende Induktion zurückgeführt werden.

Beim Nachweis der Methicillinresistenz durch Resistenztestung besteht generell das Problem in der Erkennung von Stämmen mit MHK-Werten, die nahe an oder unter den offiziellen Grenzwerten liegen. Bei typischem Krankheitsbild sollte daher in Zweifelsfällen zusätzlich die Bestimmung des *mecA*-Gens bzw. des PBP2a-Antigens erwogen werden. Hierbei handelt es sich jedoch um Einzelfälle. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bestimmte Methoden der Resistenztestung die Oxacillinresistenz auch bei MRSA mit PVL zuverlässig nachweisen können. Demnach haben diese Methoden im Routinelabor als kostengünstige, wenn auch langsamere Alternative zu den Methoden des Nachweises des *mecA*-Gens und dessen Genprodukts PBP2a durchaus ihre Berechtigung.

.

6 Literatur

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

- [2] Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H.
Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks.
Clin. Microbiol. Rev. 1997; 10: 505-520.

- [3] Tenover FC, Gaynes RP.
The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections.
In: Gram-positive Pathogens (Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI Eds.) 2000; pp.414-421.
American Society for Microbiology, Washington, DC.

- [4] Linde H, Lehn N.
Infektionen mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukozidin.
Dtsch. Med. Wochenschr. 2005; 130: 2397-2401.

- [5] Holden MTG et al.
Complete Genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance.
Proc. Natl. Acad. Sci. of the USA 2004; 101: 9786-9791.

- [6] Garzoni et al.
A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells.
BMC Genomics 2007, 8:171.

- [7] Linde H, Lehn N.
Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) – Diagnostik.
Dtsch. Med. Wochenschr. 2005; 130: 582-585.

- [8] Boyle-Vavra S, Yin S, Daum R S.
The *VraS/VraR* two-component regulatory system required for oxacillin resistance in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
FEMS Microbiol. Lett. 2006; 262: 163-171.

-
- [9] Jevons MP.
„Celbenin“-resistant staphylococci.
Br. Med. J. 1961; 1: 124-125.
- [10] Hartman B, Tomasz A.
Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of
Staphylococcus aureus.
Antimicrob. Agents. Chemoter. 1981; 19: 726-735.
- [11] Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC.
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced
vancomycin susceptibility.
J. Antimicrob. Cemother. 1997; 40:135-136.
- [12] Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, et al.
Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin isolated from
a patient with fatal bacteremia
Emerg. Infect. Dis. 1999; 5:147-149.
- [13] Fridkin SK.
Vancomycin-intermediate and -resistant Staphylococcus aureus: what the
infectious disease specialist needs to know.
Clin. Infect. Dis. 2001; 32:108-115.
- [14] Hageman JC, Pegues DA, Jepson C, et al.
Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in a home health-care patient.
Emerg. Infect. Dis. 2001; 7:1023-1025.
- [15] Linde HJ, Lehn N.
Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*.
Pharm. unserer Zeit 2006; 5: 422-425.
- [16] Linezolid (Zyvoxid®): Erhöhte Mortalität bei schweren Haut- und
Weichteilinfektionen, die nicht ausschließlich durch grampositive Erreger
verursacht werden – Anwendungsbeschränkungen beschlossen.
In: *Pharmakovigilanz/Risikoinformationen*.
Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, 16.03.2007.
- [17] Kitzis M D, Ly A, Goldstein FW.
In Vitro Activities of Tigecycline (GAR-936) against Multidrug-Resistant
Staphylococcus aureus and *Streptococcus pneumoniae*.
Antimicrob. Agents. Chemother. 2004; 48(1): 366–367.

-
- [18] Enright MC.
Genome of an epidemic community-acquired MRSA.
Lancet 2006; 367: 705-706.
- [19] Stefani S, Varaldo PE.
Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe.
Clin. Microbiol. Infect. 2003; 9(12):1179-86.
- [20] Kipp F, Friedrich AW, Becker K, von Eiff C.
Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter *Staphylococcus-aureus*-Stämme.
Dtsch. Arztebl. 2004;101:2045-2050.
- [21] Woltering R, Hoffmann G, Daniels-Haardt I, Gastmeier P, Chaberny IF.
MRSA-Prävalenz in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen eines Landkreises.
Dtsch. Med. Wochenschr. 2008; 133 (19): 999-1003.
- [22] Mempel M, Kerzl R, Ring J.
Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA)- Relevanz in der Dermatologie.
Hautarzt 2008; 59:659–666.
- [23] Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, Leitch CD, Daum RS.
Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk.
JAMA 1998; 279:593-598.
- [24] Jimmerson CJ, Coker AL, Bockmon W et al.
Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in urban men who have sex with men: A sexually transmitted disease?
44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004, Washington D C, USA, Abstract # L-1602a.
- [25] Lindenmayer JM, Schoenfeld S, O'Grady R et al.
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a high school wrestling team and the surrounding community.
Arch. Intern. Med. 1998; 158: 895-899.
- [26] Centers for Disease Control.
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in correctional facilities- Georgia, California and Texas, 2001-2003.
MMWR 2004; 52: 992-996.

-
- [27] O'Brien FG, Price C, Grubb WB, Gustafson JE.
Genetic characterisation of the fusidic acid and cadmium resistance determinants of *Staphylococcus aureus* plasmid pUB101.
J. Antimicrob. Chemother. 2002; 50:313-321.
- [28] Baba T, Takeuchi F, Kuruoda 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.
- [29] Linde H, Wagenlehner F, Strommenger B, Drubel I, Tanzer J, Reischl U, Raab U, Holler C, Naber KG, Witte W, Hanses F, Salzberger B, Lehn N.
Healthcare-associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leukocidin gene in southeastern Germany.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2005; 24: 419-422.
- [30] Klevens RM, Morrison MA, Fridkin SK, Reingold A et al.
Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors.
Emerg. Infect. Dis. 2006;12: 1991-1993.
- [31] Linde H, Lehn N.
Community-associated MRSA: Klinik, Therapie, Hygiene.
Krankenhaushygiene update 2008; 3: 29-44.
- [32] Cuny C, Kuemmerle J, Stanek C, Willey B et al.
Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans.
Euro. Surveill. 2006;11: 44-47.
- [33] de Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, Santen-Verheuvél MG et al.
High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs.
Vet. Microbiol. 2007; 122: 366-372.
- [34] Vandembroucke-Grauls CM, Beaujean DJ.
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig breeders and cattle breeders.
Ned. Tijdschr. Geneesk. 2006; 150:1710-1712.
- [35] Khanna T et al.
Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig Farmers
Vet. Microbiol. 2007; doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.006

-
- [36] Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB et al.
Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community.
J.Clin.Microbiol. 2002; 40: 4289-4294.
- [37] Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G et al.
Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence.
Emerg. Infect. Dis. 2003; 9: 978-984.
- [38] Panton PN, Valentine FCO.
Staphylococcal toxin.
Lancet 1932; 222: 506-508.
- [39] Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M et al.
Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia.
Clin. Infect. Dis. 1999; 29: 1128-1132.
- [40] Miller LG, Quan C, Shay A, Mostafaie K et al.
A prospective investigation of outcomes after hospital discharge for endemic, community-acquired methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* skin infection.
Clin. Infect. Dis. 2007; 44: 483-492.
- [41] Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G et al.
Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006.
Emerg. Infect. Dis. 2007; 13: 594-600.
- [42] Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL et al.
Staphylococcus aureus Panton Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia.
Science 2007; 315: 1130-1133.
- [43] Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P et al.
Panton-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities.
Infect. Immun. 1995; 63: 4121-4129.

- [44] Kaneko J, Kimura T, Narita S et al.
Complete nucleotide sequence and molecular characterisation of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes.
Gene 1998; 215: 57-67.
- [45] Kaneko K, Kamio Y.
Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organisation of the genes.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004; 68: 981-1003.
- [46] König B, Prevost G, Piemont Y et al.
Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes.
J. Infect. Dis. 1995; 171: 607-613.
- [47] Colin DA, Monteil H.
Control of the oxidative burst of human neutrophils by staphylococcal leukotoxins.
Infect. Immun. 2003; 71: 3724-3729.
- [48] Szmigielski S, Prevost G, Monteil H et al.
Leukocidal toxins of staphylococci.
Zentralbl. Bakteriologie 1999; 289: 185-201.
- [49] Gladstone GP, Mudds S, Hochstein HD et al.
The assay of anti-staphylococcal leukocidal components (F and S) in human serum.
Br. J. Exp. Pathol. 1962; 43: 295-312.
- [50] Becker K.
Diagnostik von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämmen. Teil 2. Nachweis der Methicillin/Oxacillin-Resistenz bei *Staphylococcus aureus*.
Mikrobiologie 2004; 14: 41-50.
- [51] Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B et al.
Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR.
J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 2429-2433.

-
- [52] Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, Jabes D et al.
New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity.
Antimicrob. Agents Chemother. 1989; 33: 1869-1874.
- [53] Matsushashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue K, Ubikata N, Yamashita N, Konno M.
Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*.
J. Bacteriol. 1986; 167: 975-980.
- [54] Pinnho MG, de Lencastre H, Tomasz A.
An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug resistant staphylococci.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001; 98: 10886-10891.
- [55] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K.
A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*.
Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 1549-1555.
- [56] Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF.
A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci.
Science 2001; 291: 1962-1965.
- [57] Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I.
Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with ceftiofur and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test.
J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 2766-2771.
- [58] Swenson JM, Tenover FC.
Results of disk diffusion testing with ceftiofur correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp.
J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 3818-3823.
- [59] Witte W.
cMRSA: Heteroresistenztyp erfordert besondere diagnostische Aufmerksamkeit.
Epidemiologisches Bulletin 2005; 50: 466-467.

-
- [60] Monecke S, Berger-Bachi B, Coombs G, Holmes A et al.
Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Panton-Valentine leukocidin.
Clin. Microbiol. Infect. 2007; 13: 236-249.
- [61] Martineau F, Picard F J, Roy P H, Ouellette M, Bergeron M G.
Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*.
J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 618–623.
- [62] Reischl U, Pulz M, Ehret W, Wolf H.
PCR-based detection of mycobacteria in sputum samples using a simple and reliable DNA extraction protocol.
BioTechniques 1994; 17: 844–845.
- [63] Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW et al.
Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the *lukS-PV* gene.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2007; 26: 131-135.
- [64] Reischl U, Youssef MT, Kilwinski J, Lehn N, Zhang WL, Karch H, Strockbine NA.
Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.
J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 2555–2565.
- [65] Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J et al.
Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management.
J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 5442-5448.
- [66] Enright M C, Day N P J, Davies C E, Peacock S J, Spratt B G.
Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*.
J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 1008-1015 .
- [67] Jordens J Z, Pennington T H.
Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates by ribosomal RNA gene restriction patterns and restriction endonuclease digestion of chromosomal DNA.
Epidemiol. Infect. 1991; 107: 253–262.

-
- [68] Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE et al.
Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department.
N. Engl. J. Med. 2006; 355: 666-674.
- [69] Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D et al.
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006.
J. Antimicrob. Chemother. 2007; doi:10.1093/jac/dkm384
- [70] Ben Nsira S, Dupuis M, Leclercq R.
Evaluation of MRSA Select, a new chromogenic medium for the detection of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
Int. J. Antimicrob. Agents 2006; 27: 561-564.
- [71] Swenson JM, Spargo J, Tenover FC, Ferraro MJ.
Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*.
J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 3781-3784.
- [72] Geiss HK, Mack D, Seifert H.
Konsensuspapier der DGHM, DGI und PEG zur Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und zur Interpretation von Ergebnissen der Antibiotikaempfindlichkeitstestung bei grampositiven und gramnegativen Erregern.
Mikrobiologie 2003; 13: 222-239.
- [73] Fang H, Hedin G.
Use of cefoxitin-based selective broth for improved detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 592-594.
- [74] Perry JD, Davies A, Butterworth LA, Hopley AL et al.
Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 4519-4523.
- [75] Skov R, Smyth R, Larsen AR, Bolmstrom A et al.
Phenotypic Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* by Disk Diffusion Testing and Etest on Mueller-Hinton Agar.
J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 4395-4399.

-
- [76] Diederens BM, van Leest CM, van D, I, Willemse P et al.
Evaluation of *S. aureus* ID, a Chromogenic Agar Medium for the Detection of *Staphylococcus aureus*.
Infection. 2006; 34: 95-97.
- [77] Kluytmans-Vandenbergh MF, Kluytmans JA.
Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives.
Clin. Microbiol. Infect. 2006; 12 Suppl 1: 9-15.
- [78] Nahimana I, Francioli P, Blanc DS.
Evaluation of three chromogenic media (MRSA-ID, MRSA-Select and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
Clin. Microbiol. Infect. 2006; 12: 1168-1174.
- [79] Athanasopoulos A, Devogel P, Beken C, Pille C et al.
Comparison of three selective chromogenic media for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* detection.
Pathol. Biol. (Paris) 2007; 55: 366-369.
- [80] Han Z, Lautenbach E, Fishman N, Nachamkin I.
Evaluation of mannitol salt agar, CHROMagar Staph aureus and CHROMagar MRSA for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal swab specimens.
J. Med. Microbiol. 2007; 56: 43-46.
- [81] Louie L, Soares D, Meaney H, Vearncombe M et al.
Evaluation of a new chromogenic medium, MRSA select, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 4561-4563.
- [82] Robinson DA, Enright MC.
Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10: 92-97.

7 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

- Tabelle 1:** *mecA*- und *lukS*-PV-Gen-Status, *spa*- und MLST-Typ sowie Herkunft und Eigennamen der *S. aureus*-Stämme_____16
- Tabelle 2:** Erkennung der Oxacillinresistenz von *S. aureus* mit positivem *mecA*-Gen-Nachweis durch verschiedene phänotypische Methoden_____33
- Tabelle 3:** MHK₉₀-Werte (90 %-Perzentile) bzw. Hemmhofdurchmesser von MRSA mit und ohne PVL für verschiedene Antibiotika_____36
- Abbildung 1:** Verteilung der Hemmhofdurchmesser von 25 MRSA mit PVL und 9 MRSA ohne PVL sowie 3 MSSA und Grenzwerte nach CLSI (21 mm) bzw. Felten (27 mm) für Cefoxitin-Agardiffusion bei 30°C und 35°C
Bebrütungstemperatur_____39

8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Hans Wolf und Herrn Professor Dr. Norbert Lehn, sowie Herrn Professor Dr. Dr. André Gessner und Herrn PD Dr. Wulf Schneider für die Möglichkeit meiner Doktorarbeit im Bereich der medizinischen Mikrobiologie.

Für die Betreuung und Begleitung der Arbeit im Praktischen wie im Schriftlichen möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Hans-Jörg Linde sehr herzlich bedanken, welcher mir weit über das für die Arbeit Notwendige hinaus ermöglicht hat, im Bereich der medizinischen Wissenschaften zu lernen und Erfahrungen zu sammeln.

Ebenso gilt mein Dank Herrn PD Dr. Wulf Schneider, welcher freundlicherweise die Betreuung in der Endphase meiner Arbeit übernahm.

Herzlichst gedankt sei auch Frau Ursula Haas für ihre Anleitung im Praktischen und jederzeit hilfreiche und tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Nährbodenküche, sowie allen Mitarbeitern des Instituts, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für die kostenlose Bereitstellung der Chromagarnährböden danke ich den Firmen Becton Dickinson, bioMérieux, Bio-Rad und Oxoid.

Letztendlich ermöglicht haben mir meine Arbeit meine Eltern Gabriele und Dr. Paul Pirzer, welche mir zu jeder Zeit ideelle wie materielle Unterstützung zukommen ließen

9 Lebenslauf

Name: Pirzer
Vorname: Eva
Geburtsdatum: 05.02.1982
Geburtsort: Amberg
Anschrift: Fallweg 17
92224 Amberg
Telefon: +49 (9621) 42687 oder +49 (170) 5547223
E-Mail: Eva.Pirzer@gmx.de
Familienstand: Ledig
Konfession: Römisch-Katholisch
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Eltern: Dr. Paul Pirzer
OStRin Gabriele Pirzer, geb. Maier
Geschwister: Barbara Pirzer, Sybille Pirzer, Anna Pirzer

Schulbildung:

1988 - 1992	Albert-Schweitzer-Schule in Amberg
1992 - 2001	Max-Reger-Gymnasium in Amberg
Mai 2001	Abitur

Studium:

2001 - 2006	Studium der Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg
2002	Zahnärztliches Vorphysikum
2004	Zahnärztliche Vorprüfung
2006	Zahnärztliche Prüfung
2007	Approbation als Zahnärztin Aufnahme der Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg unter Betreuung von Prof. Dr. Hans-Jörg Linde
Januar - Juni 2007	Praktischer Teil der Doktorarbeit

Berufliche Tätigkeit:

Juli 2007 – Dezember 2008 Assistenz Zahnärztin in der Gemeinschaftszahnarztpraxis
Dr. Sapundzieva-Bwete und Dr. Scurtu in Münchsmünster

Seit 2009 Zahnärztliche Tätigkeit in Irland